

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

TAMIRIS CRISTINE RIBEIRO FERREIRA

***Toxoplasma gondii*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E  
MOLECULAR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE GALINHAS (*Gallus  
gallus domesticus*) EM PROPRIEDADES RURAIS DO ESTADO DO  
ESPÍRITO SANTO, BRASIL.**

VITÓRIA  
2016

TAMIRIS CRISTINE RIBEIRO FERREIRA

***Toxoplasma gondii*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) EM PROPRIEDADES RURAIS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Blima Fux

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Ferreira, Tamiris Cristine Ribeiro, 1987 -  
F383t      Toxoplasma gondii: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS PROVENIENTES  
DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) EM PROPRIEDADES  
RURAIS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL / Tamiris  
Cristine Ribeiro Ferreira – 2016.  
72 f. : il.

Orientador: Blima Fux.

Coorientador: Ricardo Wagner de Almeida Vitor.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Toxoplasma gondii. 2. Isolamento. 3. Técnicas de  
Genotipagem. I. Fux, Blima. II. Almeida Vitor, Ricardo Wagner de.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestrande TAMIRIS CRISTINE RIBEIRO FERREIRA apresentou a dissertação intitulada "*Toxoplasma gondii*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (☒ **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a enfermeira TAMIRIS CRISTINE RIBEIRO FERREIRA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 29 de abril de 2016

Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior  
(Membro Interno)

Prof. Dra. Blima Fux  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus: pelo imenso dom da vida. Por me mostrar que “*não se acende a candeia e se coloca debaixo do alqueire* (Mateus 5, 15)”, por isso, da mesma forma Ele me deu a vida, para vivê-la bem. E o importante é recomeçar: sempre, logo e com alegria.

Aos meus pais, por serem instrumentos de Deus ao me darem a vida. Especialmente à minha mãe, pela criação, educação e amor dedicado. Às minhas irmãs, Cynthia e Ana Paula, pelo apoio, exemplo e amor.

À Monica Leal Alcure, por ter sido a primeira pessoa a acreditar no meu sonho e sempre ter me incentivado a continuar, mesmo quando tudo parecia tomar um rumo diferente.

À minha orientadora Blima Fux, pela confiança e ensinamentos.

Às amigas, unidas pela fé e o amor recíproco: Cibele Lana, Heloiza Merlin, Carolina Nolasco, Gabriela Nolasco, Gabriela Pavan, Naiara Coan, Nayara Bernardes, Fernanda Louzada, Mariana Gualhano e Vera Lúcia Medeiros.

Às amigas Nadir Garcia e Melina Borges.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia da UFES, pelo aprendizado desde as atividades mais básicas, como preparar um material para autoclavar, até a coleta de sangue do plexo retro-orbital do camundongo ou da veia braquial da galinha, além do constante incentivo. São eles: Adelson, Claudiney, Steveen, Nayara, Priscila, Kamila, Sarah, Cinara, Maria Augusta, Leonardo, Luciana Stanzani, Wagner e Rodrigo.

A Marcus Alexandre Vaillant Beltrame, pela ajuda e disponibilidade desde o primeiro momento, para tirar dúvidas e dar dicas importantes na execução do trabalho.

Ao professor Fausto Edmundo Lima Pereira, pelas sugestões e colaboração para execução desse trabalho.

Ao professor Aloísio Falqueto, pois, além dos ensinamentos, também me apresentou alguns criadores de galinhas.

Aos proprietários dos sítios visitados, por confiarem em nosso trabalho e permitirem que o estudo fosse realizado da melhor maneira possível.

Ao Jose de Almeida (in memória), pela imensa contribuição especialmente ao me acompanhar nas visitas às propriedades e ajudar a segurar as aves para coleta do sangue.

Aos amigos que conheci ao longo do mestrado: Flávia Caselli Pacheco, Thainara Letícia, Isabela, Samira, Laura Tessmer, Stefania Henrique, Denise Turnes, Marcia Alessandra, Michel da Vitória, Patricia Marques, Caroline Maia, Gabriel Nunes, Gilton e Glênia.

Ao Departamento de Parasitologia da UFMG, pela enorme colaboração e total disponibilidade para realização desse trabalho. Especialmente ao professor Ricardo Wagner de Almeida Vitor, responsável pelo laboratório de Toxoplasmose, pois me ensinou muito e foi como um pai para mim durante o período que passei em Belo Horizonte. Um agradecimento especial aos colegas do laboratório: Ramon Baraviera, Lorena Pinto e Julia Costa, a ajuda de vocês foi fundamental.

À querida Rosálida Lopes, técnica do Laboratório de Toxoplasmose da UFMG, sem ela pouca coisa teria conseguido fazer. Aprendi muito, não só técnica, mas pessoalmente, me ensinou e cuidou muito de mim, sempre com amor e zelo de mãe.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas da UFES, pelo enorme conhecimento compartilhado.

À professora Narcisa Imaculada Brant Moreira, pela colaboração e contribuições importantes para execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho, que me ajudaram especialmente com as trocas de plantões, permitindo que assim fosse possível cumprir todos os créditos e conciliar trabalho e estudo.

A Vitor Hugo Campos, pelo amor, dedicação, companheirismo, incentivo e me ajudar a manter perseverante aos meus objetivos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

*“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.”*  
(Santo Agostinho)



## RESUMO

*Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é capaz de infectar uma grande variedade de animais e apresenta alta prevalência mundial. Os felinos são considerados os hospedeiros definitivos. Entre os hospedeiros intermediários destacamos os mamíferos (inclusive o homem) e as aves. O homem pode se infectar por meio da ingestão de cistos teciduais presentes na carne das aves de abate. Dessa forma, torna-se importante o conhecimento dos aspectos biológicos e moleculares do parasito, possibilitando maior integração com a epidemiologia. Neste trabalho, foi realizada triagem sorológica por Hemaglutinação Indireta em 57 galinhas caipiras utilizadas para consumo humano, provenientes do estado do Espírito Santo, Brasil. Destas, 13 galinhas apresentaram sorologia positiva para *T. gondii*. O coração e o cérebro de cinco galinhas positivas foram colhidos, pepsinizados e inoculados separadamente em dois camundongos suíços fêmeas pela via intraperitoneal. Observou-se taquizoítos no peritônio de todos os animais, entre sete e 10 dias após o inóculo. Obteve-se 10 isolados que foram mantidos por repique realizado com cistos cerebrais. Para caracterizar biologicamente os 10 isolados, grupos de 5 camundongos BALB/C – fêmeas foram inoculados com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos por animal. Todos os isolados foram considerados virulentos ou de virulência intermediária, ou seja, nenhum animal infectado sobreviveu após período de observação de 30 dias. A caracterização molecular dos isolados, realizada por PCR-RFLP, demonstrou a ocorrência de três genótipos distintos. Nenhum isolado apresentou genótipo clonal (Tipo I, II ou III) ou linhagem clonal do Brasil (BrI, BrII, BrIII e BrIV). Não foi observada diferença molecular (padrões de PCR-RFLP) entre os isolados obtidos a partir do cérebro ou do coração da mesma ave. Dois isolados já haviam sido relatados na literatura como causadores de doenças em humanos. Esses resultados contribuíram para conhecer as cepas circulantes no estado do Espírito Santo e que já foram identificadas em outros locais do Brasil e do mundo.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Isolamento. Caracterização biológica. Genotipagem.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii*, source of toxoplasmosis, is able to infect a wide variety of animals and presents high prevalence worldwide. Felines are considered the parasite's definitive hosts. Among the intermediate hosts, mammals (including the man) and birds are the most important. Humans can be infected by the ingestion of tissue cysts present in the meat of processed birds. In this manner, it is important to know the parasite's biological and molecular aspects, enabling higher integration to its epidemiology. In this study, taken place in the state of Espírito Santo, Brazil, 57 free-range chickens used for human consumption were submitted to serological trial using indirect hemagglutination. From these, 13 chickens were considered positive. The hearts and brains of five positive chickens were collected, pepsinized and inoculated separately in two female Swiss mice via intraperitoneal injection. Tachyzoites were observed in the peritoneum of all these animals between seven and ten days after inoculation. 10 isolates were obtained and maintained by successive culture with brain cists. To biologically characterize the isolates, groups of 5 female BALB/C mice were inoculated with  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  tachyzoites per animal. All isolates were considered virulent or with intermediate virulence, that is, no infected animal has survived after a 30-day observation period. The molecular characterization of the isolated, performed by PCR-RFLP, has demonstrated the occurrence of three distinct genotypes. No isolated has presented clonal genotypes (types I, II or III) or Brazil's clonal lineage (BrI, BrII, BrIII and BrIV). There was no molecular differences (PCR-RFLP patterns) observed between the isolates obtained from the brain or heart of the same bird. Two isolates had already been reported in literature as source of diseases in humans. These results contributed to identify the circulating strains in the Espírito Santo region that have already been identified in other places in Brazil and around the globe.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Isolation. Biological characterization. Genotyping.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	24
Figura 2: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com $10^1$ , $10^2$ , $10^3$ , $10^4$ taquizoítos dos isolados TgCkBrEs1b e TgCkBrEs1h de <i>T. gondii</i> . ....	45
Figura 3: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com $10^1$ , $10^2$ , $10^3$ , $10^4$ taquizoítos do isolado TgCkBrEs2b e TgCkBrEs2h de <i>T. gondii</i> .....	46
Figura 4: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com $10^1$ , $10^2$ , $10^3$ , $10^4$ taquizoítos do isolado TgCkBrEs3b e TgCkBrEs3h de <i>T. gondii</i> .....	47
Figura 5: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com $10^1$ , $10^2$ , $10^3$ , $10^4$ taquizoítos do isolado TgCkBrEs4b e TgCkBrEs4h de <i>T. gondii</i> .....	48
Figura 6: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com $10^1$ , $10^2$ , $10^3$ , $10^4$ taquizoítos do isolado TgCkBrEs5b e TgCkBrEs5h de <i>T. gondii</i> .....	48
Figura 7: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus L358 de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene L358 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HaeIII+NotI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). ....	50

Figura 8: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c29-2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene c29-2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HpyCH4IV+Rsal. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

.....50

Figura 9: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c22-8 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene c22-8 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição BsmAI+MboII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II), VEG (Tipo III), GT1 (tipo I), MAS (U-1) e CH4 (U-1) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). ....51

Figura 10: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus PK1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene PK1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição Aval+Rsal. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega100pb). .....52

Figura 11: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição Sau96I+HaeII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II), VEG (Tipo III), MAS (U-1), CH8 (U-1), TgCtBr21 (U-1) e TgCtBr22 (U-1) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). .....52

Figura 12: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus GRA6 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene GRA6 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MseI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). .....53

Figura 13: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus BTUB de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene BTUB foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com endonucleases de restrição BsiEI + TaqI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb). .....53

Figura 14: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus Cs3 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O cromossomo VII Cs3 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com endonucleases de restrição Nla III - MboI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb). .....54

Figura 15: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG2 NEW de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG2 NEW foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HinfI+TaqI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). .....54

Figura 16: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 5'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene 5'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MboI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). .....55

Figura 17: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 3'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene 3'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonucleases de restrição HhaI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). ....55

Figura 18: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG3 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG3 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição Nci I. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). .....56

Figura 19: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus Apico de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene Apico foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição AfIII+DdeI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb). ....56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de anticorpos anti <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas avaliadas no Brasil, com ou sem isolamento do protozoário. (Fonte: BELTRAME, 2010, modificado)	29
Tabela 2: Prevalência de anticorpos anti <i>Toxoplasma gondii</i> em galinhas avaliadas em diferentes países, com ou sem isolamento do protozoário (Fonte: BELTRAME, 2010, modificado).....	29
Tabela 3: Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, seguido dos respectivos iniciadores para amplificação e enzimas de restrição de polimorfismo. ....	41
Tabela 4: Relação de galinhas caipiras que apresentaram anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> nas propriedades de Cariacica, Viana e Venda Nova do Imigrante.....	42
Tabela 5: Número de amostras que apresentaram anticorpos anti – <i>Toxoplasma gondii</i> e quais galinhas utilizadas de cada propriedade da região de Venda Nova do Imigrante, ES. ....	43
Tabela 6: Avaliação de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> nas aves sacrificadas em cada propriedade pelo método de ELISA. ....	44
Tabela 7: Classificação da virulência em camundongos Balb/ C dos isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de galinhas caipira no estado do Espírito Santo .....	49

Tabela 8: Associação entre os genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* com propriedade de origem, a virulência e similaridade com outros isolados já descritos ....57

Tabela 9: Genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* de galinha caipira obtidos do Estado do Espírito Santo.....58



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CDC – Center for Diseases Control and Prevention

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

dATP - 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP - 2'-deoxicitosina 5'-trifosfato

dGTP - 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

dTTP - 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio Imunoenzimático Associado a Enzima

ES – Espírito Santo

EUA – Estados Unidos da América

i.p. – intraperitoneal

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFAT – Imunofluorescência Indireta

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

LAT –Teste de Aglutinação em Látex

M – Molar

MAT – Teste de Aglutinação Modificada

mg - Miligrama(s)

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro(s)

mm - Milímetro(s)

mM - Milimolar

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

pb - Pares de bases

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pmol - Picomol(s)

q.s.p - Quantidade suficiente para

RFLP – Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição

SNC – Sistema Nervoso Central

Taq - *Thermophillus aquaticus*

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – World Health Organization

µg - Micrograma(s)

µL - Microlitro(s)

µm - Micrômetro(s)

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	HISTÓRICO .....	21
1.2	CICLO BIOLÓGICO .....	22
1.3	TRANSMISSÃO .....	24
1.4	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MAIS UTILIZADAS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> .....	25
1.4.1	Dye test .....	25
1.4.2	Teste de aglutinação em látex (LAT) .....	26
1.4.3	Imunofluorescência Indireta (IFAT) .....	26
1.4.4	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	26
1.4.5	Hemaglutinação Indireta (IHAT) .....	27
1.4.6	Teste de Aglutinação Modificada (MAT) .....	27
1.5	SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM ANIMAIS DOMÉSTICOS .....	27
1.6	DIVERSIDADE CLONAL DAS CEPAS .....	30
1.7	GENOTIPAGEM – RFLP .....	32
2	JUSTIFICATIVA .....	33
3	OBJETIVOS .....	34
3.1	OBJETIVO GERAL .....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1	AMOSTRAS .....	35
4.2	APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA .....	35
4.3	TESTES SOROLÓGICOS .....	36
4.3.1	Hemaglutinação Indireta (HAI) .....	36
4.3.2	ELISA .....	36

4.4	AMOSTRAS DE TECIDOS DOS ANIMAIS POSITIVOS.....	36
4.5	ISOLAMENTO DO <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAMUNDONGOS .....	37
4.5.1	Digestão péptica das amostras.....	37
4.5.2	Inoculação em camundongos.....	37
4.5.3	Manutenção dos isolados .....	38
4.6	DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> ...	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS .....	38
4.8	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> .	39
4.8.1	Extração do DNA .....	39
4.8.2	Análise Genética por Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR – RFLP) .....	39
4.9	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE GENOTIPAGEM.....	40
5	RESULTADOS .....	42
5.1	PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI <i>Toxoplasma gondii</i> EM AMOSTRAS DE SORO DE GALINHAS CAPIRAS, EM PROPRIEDADES DE CARIACICA, VIANA E VENDA NOVA DO IMIGRANTE NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, UTILIZANDO O MÉTODO DE HAI. ....	42
5.2	SELEÇÃO DE GALINHAS CAPIRAS QUE APRESENTARAM ANTICORPOS ANTI – <i>Toxoplasma gondii</i> PELA TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA.....	42
5.3	ISOLAMENTO DO <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS .....	44
5.4	DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS .....	44
5.5	ANÁLISE GENOTÍPICA.....	49
6	DISCUSSÃO .....	59
7	CONCLUSÃO .....	63
8	REFERÊNCIAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Levine (1988), *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao Filo Protozoa, Sub-filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Família Sarcocystidae Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero Toxoplasma. *T. gondii* é capaz de infectar qualquer animal homeotérmico. Estima-se que um terço da população humana esteja infectada por este parasito (WEISS; DUBEY, 2009). E ocupa o quarto lugar na ocorrência mundial de parasitos de origem alimentar, estando atrás somente de *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, todos membros da família Taeniidae (WHO, 2014).

### 1.1 HISTÓRICO

Em 1908, Nicolle e Manceaux identificaram o parasito pela primeira vez em um roedor norte africano, chamado *Ctenodactylus gundi*. No mesmo ano, Splendore fez identificação similar em um coelho. Ambos acreditavam se tratar de uma forma particular de *Leishmania*, porém para a época haviam poucos recursos que permitissem identifica-lo (FERGUSON, 2009).

A infecção humana foi descrita pela primeira vez por Janku, em 1923, em uma criança que foi a óbito na cidade de Praga, na República Tcheca. Em 1927, foi identificada a presença de um microrganismo em cortes histológicos de cérebros, miocárdio e músculo esquelético de um recém-nascido falecido no 29º dia de vida, no Rio de Janeiro, acreditando ser causada pelo *T. gondii* (VAZ et al., 2011).

Utilizando técnicas anteriormente empregadas em estudos de vírus, demonstrou-se que o *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório (SABIN; OLITSKY, 1937). Os pesquisadores também observaram que ratos, ao se alimentarem de animais infectados, também poderiam se infectar, demonstrando a possibilidade de infecção oral.

A infecção congênita no homem foi descrita pela primeira vez por Wolf e Cohen (1937), ao relatar a ocorrência de toxoplasmose em um recém-nascido diagnosticado com encefalite, meningite e mielite.

Porém, somente em 1948, Sabin e Feldman desenvolveram um teste sorológico para o diagnóstico da toxoplasmose, chamado teste do corante (*Dye Test*). Essa técnica se baseia na titulação de anticorpos anti-*T. gondii* no soro dos pacientes, por meio de uma solução com azul de metileno. A ausência de reação indica a presença desses anticorpos no soro (REITER – OWONA et al, 1999). O desenvolvimento deste teste tornou possível demonstrar a alta prevalência dessa patologia ao redor do mundo (VAZ et al., 2011).

Em 1970 constatou-se que os oocistos representam a fase sexuada do ciclo de vida do *T. gondii*, mas foi em 1972 que Miller e colaboradores provaram que os felinos são os únicos mamíferos capazes de abrigar o ciclo sexuada e excretar oocistos. Ainda nos anos 70, observou-se um aumento nos casos de toxoplasmose em humanos, em pacientes submetidos a tratamento com imunossupressores após transplante de órgãos ou de medula óssea e também no tratamento de algumas doenças neoplásicas (VAZ et al., 2011). Relacionada a este fato está também o surgimento da epidemia de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), em que o *T. gondii* emergiu como uma das infecções oportunistas mais importantes (FERGUSON, 2009).

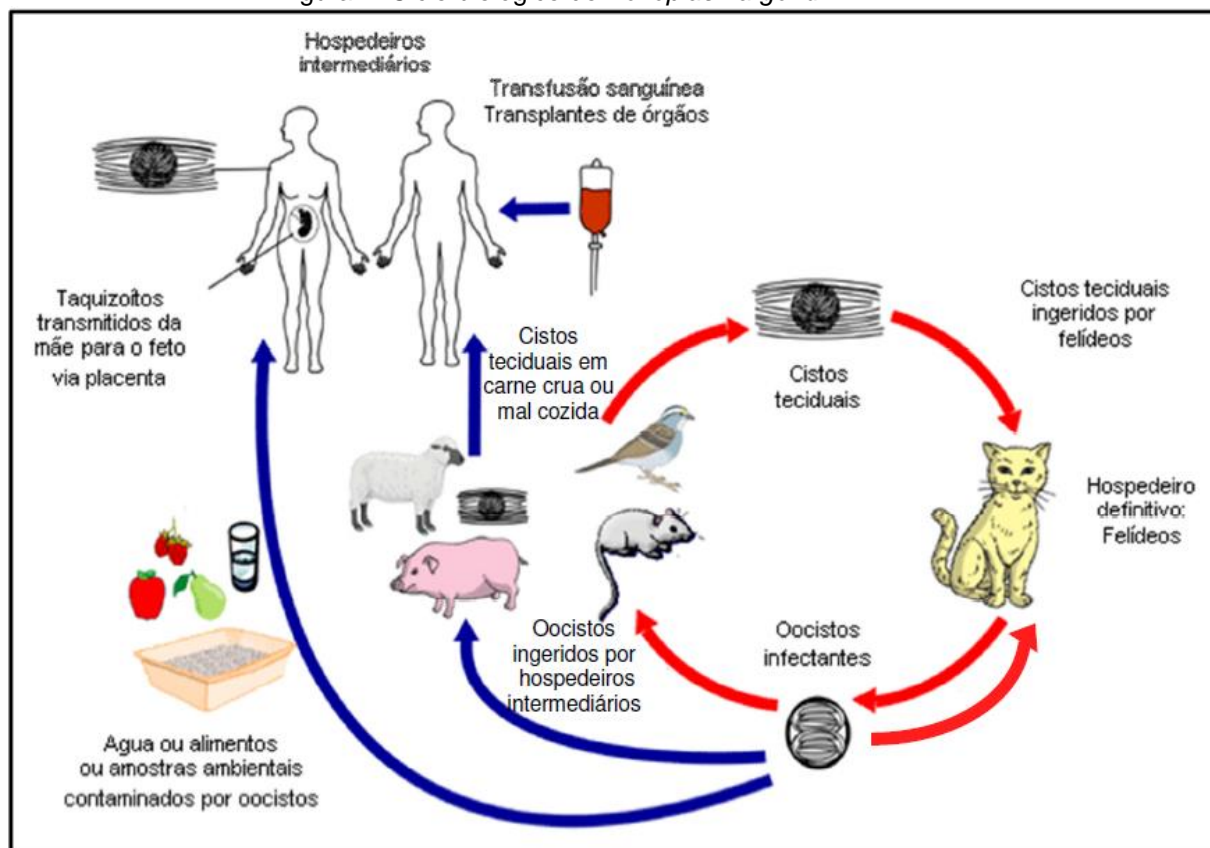
## 1.2 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteróximo facultativo (Figura 1). Seu ciclo pode continuar indefinidamente por transmissão de cistos teciduais entre hospedeiros intermediários, como aves e mamíferos, incluindo o homem, mesmo na ausência dos hospedeiros definitivos, os membros da família Felidae (TENTER; HECKEROTH; WESS, 2000).

Existem três formas infecciosas no ciclo de vida do *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais, e os esporozoítos presentes em

oocistos esporulados (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Todos os três estágios são infecciosos para ambos os hospedeiros, que poderão adquirir o patógeno pelas seguintes formas: por ingestão oral de oocistos infecciosos a partir do ambiente; por ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou mal cozidas; ou por transmissão transplacentária por passagem de taquizoítos (TENTER; HECKEROTH; WESS, 2000).

No hospedeiro definitivo, os bradizoítos iniciam a esquizogonia no intestino do felino. Em seguida, inicia-se a fase sexuada com diferenciação dos gametas, fecundação e formação dos oocistos (TENDER; HECKEROTH; WESS, 2000), alcançando o ambiente por meio das fezes do animal. A esporogonia ocorre fora do hospedeiro e é quando ocorre o desenvolvimento de oócitos infecciosos que contêm dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. (WEISS; DUBEY, 2009). Os oocistos são considerados de alta resistência e disseminação ambiental por sobreviverem por longos períodos em condições adversas, poderem ser transportados mecanicamente por insetos e artrópodes e serem veiculados pela água. Após a ingestão de cistos ou oocistos pelo hospedeiro intermediário, o *T. gondii* apresenta duas fases. A primeira é a fase aguda, com multiplicação de taquizoítos, a segunda fase, conhecida como crônica, resulta na formação de cistos. Nestes, os bradizoítos multiplicam-se lentamente. Estes possuem uma membrana dupla e são resistentes às enzimas proteolíticas e ao resfriamento a 4°C por 30 dias (JACOBS; REMINGTON; MILTON, 1996). Esta forma de apresentação é a principal responsável pela transmissão desta zoonose (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Cistos se localizam predominantemente no sistema nervoso central (SNC), olhos, tecido muscular cardíaco e esquelético (DUBEY, 1994).

Figura 1: Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*

Fonte: Adaptado de CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), 2016

### 1.3 TRANSMISSÃO

Em humanos, o *T. gondii* é, normalmente, adquirido por ingestão oral de cistos contendo bradizoítos presentes em carne mal cozida; pode ocorrer também ingestão de oocistos, contendo esporozoítos, presentes no solo (MENDONÇA, 2003). Após a ingestão, os cistos ou oocistos invadem as células hospedeiras e diferenciam-se em taquizoítos e, em conjunto com a resposta imune do hospedeiro, são responsáveis pelas manifestações clínicas da infecção. Os taquizoítos podem se diferenciar em bradizoítos, se restringindo a um vacúolo parasitóforo. Esta condição se mantém por um período indefinido durante a vida do hospedeiro ou, em caso de imunossupressão, funciona como um reservatório a partir do qual ocorrem infecções locais ou disseminadas. Nos seres humanos, cistos teciduais têm uma predileção pelo sistema nervoso e muscular. As



complicações por reativação, normalmente, são encefalite e coriorretinite (WEISS; DUBEY, 2009).

Além disso, já houve relatos de surtos de toxoplasmose associados à contaminação da água por oocistos no Canadá (BOWIE et al., 1997). Outro relato de transmissão pela água foi feito por Conrad e colaboradores, 2005, onde conduziram um estudo com 305 lontras marinhas na região da Califórnia, nos Estados Unidos. Esses animais são utilizados como sentinelas para detecção do *T. gondii* em ecossistemas marinhos próximos a centros urbanos. Os resultados do estudo demonstraram que 52% dos indivíduos examinados apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Esses pesquisadores conseguiram isolar o parasito em 38 animais avaliados. Acredita-se que a fonte mais provável são os oocistos transportados pelo escoamento de água doce, contaminada com fezes de felídeos, até o mar. Em 2001, no Paraná, também houve um surto de toxoplasmose relacionado a uma cisterna que servia como principal forma de abastecimento de água no município, caracterizado por alta prevalência de sintomáticos e comprometimento ocular (VAUDAUX et al., 2010).

A transmissão vertical pode ocorrer durante a fase aguda da doença, onde a forma infectante de taquizoítos pode invadir a placenta e, eventualmente, atravessar a circulação fetal ou tecidos fetais, causando aborto, morte neonatal ou anormalidades fetais, podendo ainda reduzir significativamente a vida em crianças que sobrevivem à infecção pré-natal (TENTER; HECKEROTH; WESS, 2000).

## 1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MAIS UTILIZADAS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI – *Toxoplasma gondii*

### 1.4.1 Dye test

Foi a primeira técnica desenvolvida, por Sabin e Feldman em 1948. Era considerada o “padrão ouro” para detecção de anticorpos anti *T. gondii*. A

principal desvantagem é que requer parasitos vivos e saudáveis de soro humano como um fator acessório (REITER – OWONA et al., 1999).

#### 1.4.2 Teste de aglutinação em látex (LAT)

O antígeno solúvel é revestido sobre as partículas de látex, e a aglutinação é observada quando o soro positivo é adicionado. LAT é rápida e fácil de executar para detectar anticorpos anti-*T. gondii* IgG. LAT tem uma sensibilidade de 86-94% e uma especificidade de 100% em seres humanos, uma baixa sensibilidade de 78,6% e especificidade de 61,9% em ovelhas (ONCEL et al., 2005). É frequentemente utilizado como uma ferramenta de triagem na pesquisa epidemiológica devido à simplicidade de desempenho (HOLLIMAN; BARKER; JOHNSON, 1990).

#### 1.4.3 Imunofluorescência Indireta (IFAT)

IFAT é um teste simples para detecção de ambos os anticorpos IgG e IgM, e tem sido amplamente usado para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em seres humanos e animais (MILLER et al., 2002). Taquizoítos são incubados com o soro de teste, os anticorpos anti-espécies fluorescentes são adicionados, e o resultado é lido sob um microscópio de fluorescência. O teste mostra sensibilidades de 80 a 100% e especificidades de 91,4-95,8% (SANTOS et al., 2010). Pode ser difícil encontrar alguns conjugados específicos da espécie, e há um risco de uma possível reação cruzada com o fator reumatóide e anticorpos anti-nucleares (FILICE et al., 1983).

#### 1.4.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

O ELISA geralmente inclui o antígeno ou um anticorpo, marcado com uma enzima ao antígeno ou o anticorpo, e o substrato da reação enzimática, que pode ser modificado para testar a ambos (LIU et al., 2015). O teste de ELISA demonstrou uma sensibilidade de 88,6%, quando comparado com o MAT, que

foi de 85,7%, e uma especificidade de 98% e o MAT de 94% (GAMBLE; DUBEY; LAMBILLOTTE, 2004).

#### 1.4.5 Hemaglutinação Indireta (IHAT)

Desenvolvida por Jacobs e Lunde, em 1957, é um teste que utiliza antígenos solúveis absorvidos em hemácias de carneiro ou humana. É simples e não é espécie-específico, podendo ser usado em soros humanos e de animais. Caracteriza-se pela praticidade (VIDOTTO, 1992). Não é eficiente para pesquisas com objetivo de se detectar infecção aguda ou congênita (LIU et al., 2015).

#### 1.4.6 Teste de Aglutinação Modificada (MAT)

Para o MAT, taquizoítos são fixados em formalina e são adicionados a placas de microtitulação em forma de U, e os soros de teste diluídos são então adicionados. As amostras de soro positivas vão produzir um tapete fino de aglutinação, enquanto que as amostras negativas irão produzir um sedimento compacto de taquizoítos precipitados no fundo do poço. Este teste proporciona um excelente formato para triagem sorológica de rotina, devido à sua elevada especificidade e custo inferior ao ELISA (MAZUMDER et. al., 1988). Para detecção de anticorpos anti *T. gondii* em galinhas, o MAT foi relatado o método mais eficiente, quando comparado com ELISA, IHAT e IFAT (CASARTELLI-ALVES et al., 2014).

### 1.5 SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

A prevalência de infecção pelo *T. gondii* em animais domésticos tem sido investigada no mundo inteiro, por sorologia. Em uma pesquisa recente para determinar a frequência de anticorpos anti -*T.gondii* em soros de cães e gatos no estado do Espírito Santo, encontrou-se alta contaminação ambiental pelo

parasito e alta frequência de anticorpos anti -*T.gondii* em cães, 38,4%, utilizando a técnica de ELISA (COVRE, 2014).

Por ser facilmente infectada pela alimentação a partir do solo contaminado com oocistos, a galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) se torna um excelente sinalizador de contaminação ambiental (DUBEY et al., 2006). Para ficar mais claro ao leitor, vale ressaltar a definição de galinha caipira:

Tradicionalmente, as criações domésticas de galinha caipira, praticadas nas unidades agrícolas familiares, se caracterizam pela sua forma de exploração extensiva, na qual inexistem instalações, bem como, a adoção de práticas de manejo que contemplem eficientemente os aspectos reprodutivos, nutricionais e sanitários. (SAGRILO et al., 2003)

Predominantemente, a toxoplasmose em galinhas apresenta-se de forma subclínica e de pouca importância, porém Dubey e colaboradores (2007) relataram um surto de toxoplasmose clínica em galinhas de postura e um ganso de uma fazenda de Illinois, EUA, sendo que neste caso esses animais desenvolveram sinais neurológicos, confirmados pela sorologia e bioensaios.

Oliveira e colaboradores (2009), em um estudo realizado no nordeste do Brasil, demonstrou, em galinhas caipiras, uma soroprevalência de 53,3% (n= 152) de anticorpos anti- *T. gondii*. No Estado do Espírito Santo foi realizado o primeiro estudo de prevalência em galinhas caipiras, onde foi observada concordância entre o Teste de Hemaglutinação Indireta (IHAT) e o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) de 81,6% (BELTRAME, 2010). As Tabelas 1 e 2 resumem os estudos de prevalência da infecção pelo *T. gondii* em galinhas de diferentes localidades brasileiras e países, respectivamente.

Tabela 1 – Prevalência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em galinhas avaliadas no Brasil, com ou sem isolamento do protozoário. (Fonte: BELTRAME, 2010, modificado)

Estado	Espécie	Método	Prevalência
PR, Jaguapitã	Galinhas caip.*	RIFI	S = 10,3% (16/155)
RJ	Galinhas caip.	isol.	I = 69,8% (67/96)
SP	Galinhas caip.	MAT,isol.	S = 39,0% (32/82) / I = 78,1% (25/32)
PR	Galinhas caip.	MAT,isol.	S = 40% (16/40) / I = 81% (13/16)
AM	Galinhas caip.	MAT,isol.	S = 66% (33/50) / I = 72,2% (24/33)
RS e PA	Galinhas caip.	MAT,isol.	S = 46,4% (39/84) / I = 84,6% (33/39)
GO, Goiânia	Galinhas caip.	Isol.	I = 9,8% (6/61)
MG	Galinhas caip, e de granja	Isol.	I = 30,0% (11/37) galinha caipira, 0% (0/50) frango de granja
SP, Botucatu	Frango industrial	ELISA	S = 0% (0/185)

RIFI / IFAT – Reação de Imunofluorescência Indireta; MAT – Teste de Aglutinação Modificado; ELISA – Reação de Ensaio Imunoenzimático; I – Isolamento; S – Sorologia; Galinhas caip. – galinhas caipiras

Tabela 2 – Prevalência de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em galinhas avaliadas em diferentes países, com ou sem isolamento do protozoário (Fonte: BELTRAME, 2010, modificado)

País	Espécie	Método	Prevalência
Costa Rica	Galinhas	Isol.	I = 54% (27/50)
Nigéria, Zaria	Galinhas	HAI	S = 44,8% (112/250)
Croácia	Galinhas	Isol.	I = 0,4% (3/716)
Peru	Galinhas	MAT, isol	S = 26% (13/50) / I = 76,9% (10/13)
Argentina	Galinhas caip.*	MAT, isol	S = 65,5% (19/29) / I = 47,4% (9/19)
EUA, Ohio	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 17,0% (20/118) / I = 55% (11/20)
Egito	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 40,4% (49/121) / I = 38,8% (19/49)
México	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 6,2% (13/208) / I = 46,2% (6/13)
Israel	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 46,9% (45/96) / I = 42,2% (19/45)
Siri Lanka	Galinhas	MAT, isol	S = 39% (39/100) / I = 30,6% (11/36)
Venezuela	Galinhas	MAT, isol	S = 32% (16/46) / I = 92,3% (12/13)
Índia, Grenada	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 52% (53/102) / I = 81,4% (35/43)
Colômbia	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 44,4% (32/77) / I = 74,2% (23/31)

Áustria	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 36,3% (302/830) / I = 25,7% (56/218)
África	Galinhas	MAT, isol	S = 50% (25/50) / I = 81,8% (9/11)
Nicarágua	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 85,7% (84/98) / I = 71,2% (47/66)
Guatemala	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 74% (37/50) / I = 42,1% (8/19)
Portugal	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 27,1% (61/225) / I = 84,2% (16/19)
Costa Rica	Galinhas caip.	MAT, isol	S = 40,1% (60/144) / I = 100% (32/32)
Paquistão	Galinhas	MAT, isol	S = 0% (0/64)
Chile	Galinhas caip.	IFAT	S = 55,3% (47/85) / I = 46,8% (22/47)

RIFI / IFAT – Reação de Imunofluorescência Indireta; MAT – Teste de Aglutinação Modificado; HAI – Hemaglutinação Indireta; I – Isolamento; S – Sorologia; Galinhas caip. – galinhas caipiras

## 1.6 DIVERSIDADE CLONAL DAS CEPAS

Segundo Howe e Sibley (1995), a estrutura populacional do *T. gondii* é altamente clonal e foi evidenciada pelos isolados com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros provenientes de áreas geográficas distintas (FERREIRA et al., 2006). Marcadores moleculares têm sido usados para diferenciar isolados do *T. gondii* entre si e com outras espécies de organismos (JOHNSON, 1987). As cepas de *T. gondii* possuem características morfológicas e antigênicas semelhantes e são difíceis de serem distinguidas apenas pelo seu comportamento. É possível diferenciar estas cepas pela análise gênica baseada no polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP) (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992), sendo classificadas em três linhagens clonais, designadas tipo I, II, III, que ocorrem em humanos e animais (HOWE; SIBLEY, 1995). Estimava-se que 95% das cepas caracterizadas estivessem dentro deste padrão (KHAN et al., 2006 e KHAN, 2007). Acreditava-se que apenas 5% seriam classificadas como recombinantes, sendo 1% denominadas exóticas, porém em uma revisão publicada por Shwab e colaboradores, em 2014, relatou-se uma grande diversidade de genótipos. Neste estudo, 1457 amostras, mundialmente coletadas, foram descritos em 189 genótipos. Na América Central e do Sul não foi encontrado um predomínio de qualquer genótipo, além de ter sido observado a maior diversidade genética (Figura 2).

No Brasil, Pena e colaboradores (2008) descreveram quatro linhagens clonais mais comuns, designadas como BrI, BrII, BrIII e BrIV.

Estudos recentes têm demonstrado que o Brasil possui uma elevada população de cepas recombinantes naturais (SU et al., 2009). Esse fato tem sido relacionado a diversos fatores, como amplitude geográfica, clima tropical, fauna rica e rotas diversas de transmissão. Esta diferenciação populacional também pode ser responsável pela heterogeneidade na virulência (FERREIRA et al., 2006). Shwab e colaboradores (2014) acreditam que essa diversidade clonal, na América Central e do Sul, seja pelo fato de o *T. gondii* ser originário dessa região. Além disso, o clima mais quente permite que um maior número de oocistos sobreviva na natureza por maior período de tempo. Também é possível que, nos últimos 50 anos, um pequeno número de cepas tenha sido introduzido a partir da América do Sul para outros continentes, por via marítima e pelo transporte de animais de estimação.

Dubey e colaboradores (2002) observaram que 64% dos isolados do *T. gondii* obtidos de órgãos de galinhas em uma área rural do estado de São Paulo foram caracterizadas como do tipo I e nove caracterizados como do tipo III, não sendo observado nenhum do tipo II. No Brasil, não foi identificada nenhuma cepa de *T. gondii* do tipo II. A total ausência é impressionante, uma vez que as cepas isoladas dos EUA e Egito são do tipo II (DUBEY et al., 2002). Esses achados têm demonstrado claramente que as cepas encontradas na América do Sul divergem das encontradas na América do Norte e Europa (KHAN et al., 2006).

Os fatores de virulência dos diferentes tipos de cepas do *T. gondii* não estão bem esclarecidos (HOWE et al., 1996). O modelo mais utilizado para a avaliação fenotípica da virulência em homem é o camundongo, a partir da taxa de percentagem de mortalidade. Nestes animais é possível classificar as diferentes cepas em alta, média e baixa virulência (SILVA, 2003).

As cepas do tipo I têm se mostrado mais virulentas que as cepas tipos II e III em modelos experimentais, exibindo 100% de letalidade em camundongos

inoculados com apenas um parasito, enquanto as cepas tipos II e III apresentam virulência relativa com inóculo igual ou superior a  $10^3$  parasitos (SIBLEY; BOORTHROYD, 1992). Quanto ao comportamento biológico, alguns estudos têm demonstrado que as cepas tipos I e II têm sido associadas à infecção congênita e à alta frequência de toxoplasmose ocular adquirida em humanos, enquanto a cepa tipo III estaria associada à infecção animal (DUBEY et al., 2006).

### 1.7 GENOTIPAGEM – RFLP

Os métodos moleculares por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm se mostrado simples, reprodutíveis, sensíveis, com bom custo/benefício e aplicáveis a uma variedade de amostras animais e humanas (SU et al, 2009). Um dos principais métodos utilizados é o multilocus PCR-RFLP (Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição). Este método é baseado no uso de enzimas de restrição para reconhecer polimorfismos de nucleotídeos únicos, exibindo os diferentes padrões de bandas (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992).

Sabe-se que a comparação genotípica entre os isolados mundialmente estudados é quase que impossível, devido ao uso de diferentes marcadores. Para tentar resolver este problema, Su e colaboradores (2006) padronizaram marcadores, facilitando as análises. Utilizando uma coleção de mais de 200 marcadores, nove (c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2, BTUB, GRA6, SAG3, Apico) foram testados e analisados, demonstrando alto poder de distinção e fácil uso. Su e colaboradores (2009) sugeriram mais dois marcadores, SAG1 e alt. SAG2. O marcador CS3, localizado no cromossomo VIIa do *T. gondii*, foi utilizado por demonstrar estar fortemente ligado à virulência do parasito (PENA, 2008).



## 2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento da prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em galinhas de propriedades do Espírito Santo é importante, pois estas aves podem se tornar fonte de infecção humana se não houver um manejo adequado no preparo para consumo. Vale destacar que o estado possui uma grande população rural que alimenta-se de animais criados em sistemas artesanais, onde a infecção pelo *T. gondii* é frequente. Além disso, essas aves servem como sentinelas para contaminação ambiental, ajudando a identificar os parasitos circulantes, já que a diversidade clonal destes é imensa.

Este estudo proporcionou um maior conhecimento da classificação das cepas e de seus diferentes graus de virulência, podendo nortear os programas de educação sanitária que a visem melhorar a qualidade dos animais de abate na zona rural, especialmente nos relacionados às zoonoses que podem atingir o homem, minimizando as infecções adquiridas pela alimentação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar, por técnicas biológicas e moleculares, o *Toxoplasma gondii* em tecidos de galinhas provenientes de localidades rurais do estado do Espírito Santo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de galinhas criadas em sistema de criação extensiva (ou artesanal), utilizando o método da Hemaglutinação Indireta (HAI).
- ✓ Isolar o *T. gondii* a partir de macerados de coração e do cérebro dos animais soropositivos, inoculados em camundongo suíços.
- ✓ Avaliar a virulência do *T. gondii* em camundongos Balb/c infectados com 10, 100, 1000 e 10000 taquizoítos de cada isolado (DL50).
- ✓ Caracterizar geneticamente o *T. gondii* isolado do cérebro e do coração por polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP), usando marcadores genéticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

A média de galinhas caipiras infectadas pelo *Toxoplasma gondii* no Brasil é de 47,7% e 0% em galinhas de granja e frangos industriais, conforme observado na Tabela 1. Por isso, neste estudo, foram avaliadas apenas galinhas caipiras, utilizando 57 animais de propriedades rurais do estado do Espírito Santo.

#### **Local de coleta das amostras de sangue:**

Foram avaliadas seis propriedades do estado do Espírito Santo, sendo uma no município de Cariacica, uma em Viana e quatro em Venda Nova do Imigrante. Em todas as localidades havia pelo menos um cão ou gato. Na propriedade I, havia gado para produção de leite. Todas as galinhas utilizadas no estudo foram identificadas com dispositivos de plástico, enumerados, colocados na pata. Foi realizada a coleta de 2 ml de sangue, colhidos por punção venosa, na veia braquial ou jugular com auxílio de seringas descartáveis. O sangue foi colocado em tubos de ensaio sem anticoagulante e os soros obtidos armazenados a -20°C até realização dos ensaios imunológicos.

Todos os procedimentos executados com os animais seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal", de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA (Lei nº 6.638 de 08 de maio de 1979, Decreto nº 24645 de 10 de junho de 1934).

### 4.2 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFES (CEUA\_UFES 080/2011).

### 4.3 TESTES SOROLÓGICOS

#### 4.3.1 Hemaglutinação Indireta (HAI)

Para realização do ensaio imunológico foi utilizado o kit comercial Imuno-HAI Toxoplasmose (WAMA, São Paulo). Foram considerados positivos os soros reagentes a partir da diluição de 1:10.

#### 4.3.2 ELISA

Para confirmação da presença de anticorpos anti *T. gondii*, tanto nas galinhas selecionadas quanto nos camundongos utilizados ao longo do trabalho que não morreram, foi realizado o teste de ELISA de acordo com Clementino e colaboradores (2007), com modificações:

- a) Para as galinhas, o ELISA foi realizado de acordo com Zhu e colaboradores (2008). Os soros foram testados na diluição de 1:50. O conjugado utilizado foi uma imunoglobulina anti-IgG de galinha, marcada com peroxidase (SIGMA, produto no A-9046), diluído a 1:10000;
- b) Para os camundongos, o ELISA foi realizado de acordo com Elsaid e colaboradores (2001), com modificações. Os soros foram diluídos a 1:100, sendo utilizado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (SIGMA, no A-9046) diluído a 1:5000. Nos camundongos, a coleta de sangue foi feita pelo plexo retro-orbital, usando tubo capilar para microhematócrito.

### 4.4 AMOSTRAS DE TECIDOS DOS ANIMAIS POSITIVOS

Para realização dos experimentos, foram coletados o coração e o cérebro das galinhas e acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados e lacrados, armazenados em caixa térmica com refrigeração e encaminhados ao laboratório de Toxoplasmose da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para isolamento do parasito.

## 4.5 ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS

### 4.5.1 Digestão péptica das amostras.

Todos os órgãos coletados das galinhas caipiras soropositivas foram macerados separadamente, utilizando um macerador e submetidos à digestão péptica (pepsina 1,3g; NaCl 2,5g; HCl 2,5g; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 500mL) a 37°C por 60 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em gaze dupla, centrifugado a 700g por 15 minutos, suspenso em PBS pH 7,2 e novamente centrifugado por duas vezes para remoção da solução péptica. Ao sedimento final de aproximadamente 2,5 mL foi adicionado 2,5 mL de PBS estéril, de acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998). O procedimento foi o mesmo para as amostras do coração e do cérebro, porém, as amostras do cérebro ficaram apenas 10 minutos no banho-maria a 37°C, já que esse tecido é facilmente digerido.

### 4.5.2 Inoculação em camundongos.

Cada amostra foi inoculada em duas fêmeas de camundongos suíços, com aproximadamente 60 dias de vida, provenientes de uma colônia isenta de infecção pelo *T. gondii* do Biotério do ICB/UFMG, individualmente identificados e alojados na mesma gaiola. Cada camundongo foi inoculado pela via intraperitoneal (i.p.) com 1,0 mL, com apenas um tipo de material digeridos (cérebro ou coração), isso foi realizado em duplicata e os animais foram observados diariamente por 30 dias.

Os camundongos inoculados foram examinados de acordo com os critérios de infectividade estabelecidos por Vitor e colaboradores (1992):

1. Nos camundongos que apresentaram ascite nos primeiros dias após inoculação dos tecidos digeridos, foi realizada a pesquisa de taquizoítos na cavidade peritoneal.
2. Nos camundongos que vieram a óbito naturalmente até o 30º dia após o inóculo, foi realizada a pesquisa de cistos cerebrais e de taquizoítos no peritônio.

3. Nos camundongos sobreviventes após o 30º dia de inóculo, foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* no soro por ELISA e, em caso positivo, pesquisa de cistos no cérebro.

Os cérebros dos camundongos soropositivos foram retirados, macerados e em seguida foi adicionado 1 mL de PBS pH 7,2. Os animais foram eutanasiados com 200 µl de solução de cloridrato de xilazina 2%, ketamina, por via intraperitoneal. Para pesquisa de cistos no cérebro foram examinadas duas lâminas contendo 10 µl de amostra.

#### 4.5.3 Manutenção dos isolados

Os isolados obtidos foram mantidos por passagens sucessivas realizadas com cistos cerebrais, inoculando o macerado por via intraperitoneal em animais saudáveis. Por se tratar de isolados virulentos, os camundongos foram tratados com sulfadiazina (1mg/mL) na água da mamadeira oferecida aos animais, a partir do 3º dia até o 10º dia após a infecção. Os taquizoítos dos novos isolados foram congelados em nitrogênio líquido utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (DUBEY; BEATTIE, 1988).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii*

Para determinação da virulência dos isolados de *T. gondii*, foi realizada a caracterização biológica “*in vivo*”. Grupos de cinco camundongos Balb/ C foram divididos e inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^3$  taquizoítos de cada cepa e a sobrevivência avaliada por 30 dias (KHAN et al., 2007). Para confirmar a infecção nos camundongos sobreviventes, foi realizado o teste de ELISA.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS

Para avaliar a sobrevivência dos animais foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 para Windows.

## 4.8 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii*

### 4.8.1 Extração do DNA

Para a extração de DNA dos isolados de *T. gondii*, obtidos nas propriedades rurais do Espírito Santo, foram utilizadas massas de taquizoítos, provenientes do lavado peritoneal, previamente processadas, utilizando o kit da Promega, Wizard Genomic DNA Purification, seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspendido em água e mantido sob refrigeração a 4°C até a sua utilização no Laboratório de Toxoplasmose da UFMG.

### 4.8.2 Análise Genética por Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR – RFLP)

A caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* foi realizada por análise de polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP), com iniciadores direcionados a 12 diferentes loci (SAG1, SAG2-5'+3', SAG2-new, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c22-9, CS3, L358, PK1 e Apico), (SU et al., 2009) (tabela 3).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Personal®, contendo 2µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 5 pmol de cada iniciador e 1µL de DNA molde. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação (SU; DUBEY, 2009). O primeiro passo da amplificação foi a desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação; 63°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e 72°C por 5 minutos para a extensão final.

Os produtos originados pela PCR, 1 µl de cada amostra, foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, juntamente com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (Promega) em cuba vertical com solução de TBE (Tris

base + Ácido bórico + EDTA). Após a realização da eletroforese, o gel foi fixado por 10 minutos em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético a temperatura ambiente e corado por nitrato de prata durante 10 minutos, lavado em água destilada e adicionado em solução reveladora de NaOH e formaldeído. Em seguida, foi observado sob trasiluminação com luz branca para visualização das bandas (SANTOS; PENA; EPPLEN, 1993). Os produtos amplificados foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas (tabela 3), (New England®) segundo Su e colaboradores (2009). As digestões foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo 2µL do produto da PCR, 1µL do tampão correspondente e 2,5U (0,3µL) da enzima, a 37°C, por três horas, segundo o protocolo do fabricante. O DNA dos produtos digeridos foi purificado por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado. As cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) foram utilizadas como controle dos experimentos (FUX et al., 2003). Para confirmar as amostras que apresentaram alelos não usuais, foram utilizadas as amostras: MAS, GT1 (PENA et al., 2008); CH4, CH8 (SILVA et al., 2014); TgCtBr 21, TgCtBr 22 (CARNEIRO et al., 2013).

#### 4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE GENOTIPAGEM

Para a caracterização genotípica, foram analisados os perfis de bandas encontrados na digestão utilizando-se as endonucleases de restrição. Os dados foram analisados em um banco de dados virtual, ToxoDB: *an integrated Toxoplasma gondii database resource* ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)) e comparados com os perfis de cepas de referência (SU et al., 2009).



Tabela 3: Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, seguido dos respectivos iniciadores para amplificação e enzimas de restrição de polimorfismo.

Marcador	Cromosso	Iniciadores	PCR (pb)	Enzimas de Restrição	Referência
c22-8	Ib	F: TCTCTCTACGTGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmA I, Mbo II	Khan et al. (2005) & Su et al (2006)
c29-2	III	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV, Rsa I	Khan et al. (2005) & Su et al (2006)
L358	V	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	Hae III, Nla III	Khan et al. (2005) & Su et al (2006)
PK1	VI	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	Ava I, Rsa I	Khan et al. (2005) & Su et al (2006)
SAG2	VIII	F: ACCCATCTGCGAAGAAAAACG R: ATTTGACCGAGCGGGAGCAC	546	Hinf I, Taq I	Lehmann et al. (2000) & Su et al (2006)
BTUB	IX	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiE I, Taq I	Khan et al. (2005) & Su et al (2006)
GRA6	X	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	Mse I	Fazaeli et al. (2000) & Su et al (2006)
SAG3	XII	F: TCTGTGCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	Nei I	Grigg et al. (2001)
Apico	Plastid	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	640	Afl II, Dde I	Su et al (2006)
SAG1	VIII	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I, HaeII	Grigg et al. (2001)
5'SAG2	VIII	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	Mbol	Howe et al. (1997)
3'SAG2	VIII	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI	Howe et al. (1997)
Cs3	VIIa	F: AGCGGATTTCCAACACTGTC R: CTGCTGCATTACAAACTCC	557	Nla III, Mbol	Pena et al. (2008)

Iniciadores forward (F) e reverse (R) indicam as extremidades 5' e 3' respectivamente. **Fonte:** Su e colaboradores (2009), modificado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI *Toxoplasma gondii* EM AMOSTRAS DE SORO DE GALINHAS CAIPIRAS, EM PROPRIEDADES DE CARIACICA, VIANA E VENDA NOVA DO IMIGRANTE NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, UTILIZANDO O MÉTODO DE HAI.

Neste trabalho, foram avaliadas amostras de sangue de galinhas caipiras em seis propriedades no estado do Espírito Santo, sendo uma em Cariacica, uma em Viana e quatro em Venda Nova do Imigrante. Nestes locais, havia a presença de animais como cães, gatos e gado para produção de leite. Nos municípios de Cariacica e Viana, foram coletados sangue de oito e 16 aves, respectivamente, e analisados. Em ambos os municípios, todas as galinhas apresentaram sorologia negativa para anticorpos anti- *T.gondii* pela técnica de hemaglutinação indireta (HAI). Na região de Venda Nova do Imigrante, das 33 aves avaliadas, 13 apresentaram anticorpos anti *T. gondii* pela técnica de HAI (tabela 4).

Tabela 4: Relação de galinhas caipiras que apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas propriedades de Cariacica, Viana e Venda Nova do Imigrante.

Local	Amostras	Positivo	Negativo
Cariacica	8	0	8
Viana	16	0	16
Venda Nova do Imigrante	33	13	20
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>13</b>	<b>44</b>

### 5.2 SELEÇÃO DE GALINHAS CAIPIRAS QUE APRESENTARAM ANTICORPOS ANTI – *Toxoplasma gondii* PELA TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA

Para a realização do isolamento do *T. gondii* foram selecionadas cinco galinhas caipiras que apresentaram anticorpos anti- *T. gondii* pela técnica de HAI, sendo pelo menos uma de cada propriedade. As amostras foram enumeradas de 1 a 5,

de acordo com a ordem das coletas. Portanto, a amostra número 1 foi coletada da primeira propriedade avaliada em Venda Nova do Imigrante, onde havia cão, gato e gado, além da produção de queijo artesanal para comercialização. Das 10 aves avaliadas, duas apresentaram anticorpos anti-*T.gondii*. As amostras números 2 e 3 foram coletadas da segunda propriedade, onde havia cão e gato: das 10 aves testadas, seis apresentaram anticorpos anti-*T.gondii*. Já as amostras 4 e 5 foram coletadas da quarta propriedade e também havia presença de cão e gato: das sete aves testadas, quatro apresentaram anticorpos anti-*T.gondii*. Na terceira propriedade, nenhum animal apresentou sorologia positiva (tabela 5).

Tabela 5: Amostras de sangue de galinhas caipiras que apresentaram anticorpos anti – *Toxoplasma gondii* e identificação das respectivas propriedades da região de Venda Nova do Imigrante, ES.

Propriedade	Amostras	Positivas	Negativas	Identificação da galinha
I	10	2	8	Galinha 1
II	10	6	4	Galinha 2 e galinha 3
III	8	0	8	Não se aplica
IV	7	4	3	Galinha 4 e Galinha 5

O sangue das aves foi novamente colhido, para confirmação da sorologia pelo ELISA (tabela 6) e, em seguida, as aves foram sacrificadas. Foram retirados o coração e a cabeça no local, armazenados em sacolas plásticas identificadas e refrigeradas. As carcaças foram consumidas pelos moradores das propriedades, mediante orientação quanto ao cozimento e ao risco de adquirir toxoplasmose pelo consumo de carne crua ou mal cozida.

Tabela 6: Avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas aves sacrificadas em cada propriedade pelo método de ELISA.

Galinha	Leitura 1	Leitura 2	Média das
			leituras
1	1,067	1,067	1,067
2	0,886	0,939	0,913
3	0,677	0,791	0,734
4	0,559	0,514	0,537
5	0,276	0,264	0,270

Média negativo: 0,056875; Desvio padrão: 0,015113; Cut off: 0,102215

### 5.3 ISOLAMENTO DO *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS

Uma semana depois do inóculo, todos os camundongos apresentaram ascite com presença de taquizoítos no exsudato peritoneal e morreram. Em seguida foi realizado um repique tanto a partir do conteúdo da ascite dos camundongos quanto dos seus respectivos cérebros, mesmo sem observação de cistos. Após 45 dias, foi realizada a coleta de sangue de 160 camundongos (número obtido após os repiques para manutenção dos isolados) e realizada a sorologia para verificar animais soropositivos. Os 150 animais que apresentaram sorologia positiva pelo método de ELISA foram sacrificados e, em seguida, foi realizada a contagem de cistos cerebrais. A média foi de 400 a 500 cistos por camundongo. Em seguida, o material do cérebro macerado foi inoculado por via peritoneal, mesmo sem evidências de cistos. Os animais negativos foram sacrificados e descartados. Essa etapa foi para obtenção de taquizoítos do experimento de sobrevivência.

### 5.4 DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS

Cada isolado recebeu um nome, seguindo a seguinte ordem: Tg = *Toxoplasma gondii*; Ck = chicken (galinha); Br = Brasil; Es = Espírito Santo; o número pré-definido da ave; b ou h = brain ou heart, cérebro ou coração, respectivamente.

### Isolado **TgCkBrEs1b** e **TgCkBrEs1h**:

Os 20 camundongos inoculados com o isolado **TgCkBrEs1b** morreram num período entre 9 e 27 dias após a infecção (DAI), exceto quatro animais. Todos os animais que morreram durante o período experimental apresentaram taquizoítos no peritônio ou cistos no cérebro. Dos quatro sobreviventes após 30 dias de inóculo, um foi inoculado com 1000 taquizoítos e três com 10 taquizoítos. Nenhum dos camundongos que sobreviveram apresentaram anticorpos anti *T. gondii* pelo ELISA ou cistos no cérebro. Em relação ao isolado **TgCkBrEs1h**, dos 20 animais inoculados, 15 morreram entre 8 e 22 dias após a infecção. Dos 5 sobreviventes, apenas 2 apresentaram anticorpos anti *T. gondii* pelo ELISA. Os animais que não apresentaram anticorpos anti- *T. gondii* não foram considerados na construção da tabela 7 e da curva de sobrevivência (figura 3).

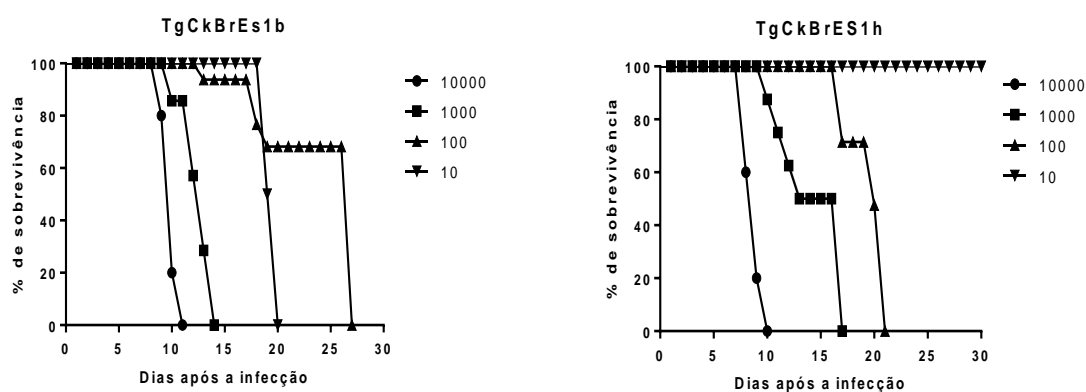


Figura 2: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos dos isolados TgCkBrEs1b e TgCkBrEs1h de *T. gondii*.

### Isolados **TgCkBrEs2b** e **TgCkBrEs2h**:

Em relação ao isolado **TgCkBrEs2b**, referente ao cérebro da galinha 2, dos 20 animais, 19 sobreviveram somente por um curto período de 10 dias. Foi observado ascite e presença de taquizoítos no peritônio de todos. Apenas um animal sobreviveu até o 26º dia. Já para o isolado **TgCkBrEs2h**, 14 dos 20

animais infectados morreram, no período entre 12 a 23 dias após a infecção, com presença de taquizoítos no peritônio. Dos seis animais sobreviventes, três foram inoculados com  $10^2$  taquizoítos e três com  $10^1$  taquizoítos, porém foram descartados por não apresentarem anticorpos anti *T. gondii*.

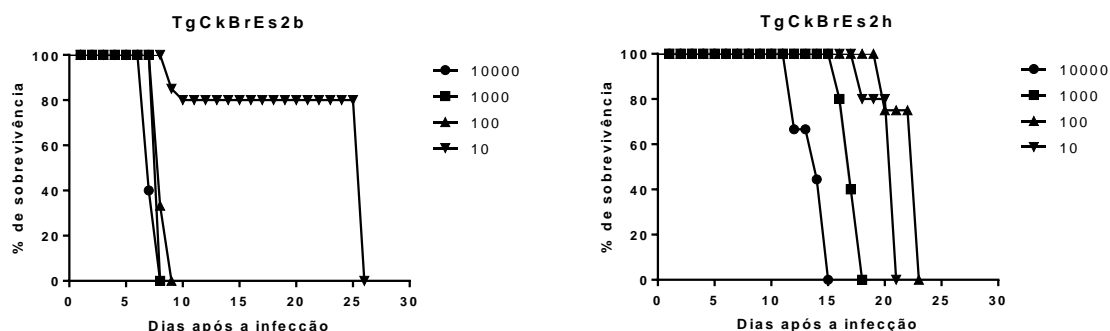


Figura 3: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos do isolado TgCkBrEs2b e TgCkBrEs2h de *T. gondii*.

### TgCkBrEs3b e TgCkBrEs3h

Em relação ao isolado **TgCkBrEs3b**, 20 animais foram inoculados e nenhum animal sobreviveu, em um período de 10 a 21 dias após a infecção. Todos apresentaram ascite e presença de taquizoítos no peritônio. Dos 20 animais infectados com o isolado **TgCkBrEs3h**, 17 sobreviveram por pouco tempo, entre o 6º e 11º dia após a infecção, com presença de ascite, e um animal sobreviveu até o 24º dia após infecção. Os dois animais sobreviventes após o período de observação de 30 dias foram infectados com  $10^1$  taquizoítos e descartados por não apresentarem anticorpos anti *T. gondii* quando avaliados pelo método de ELISA.

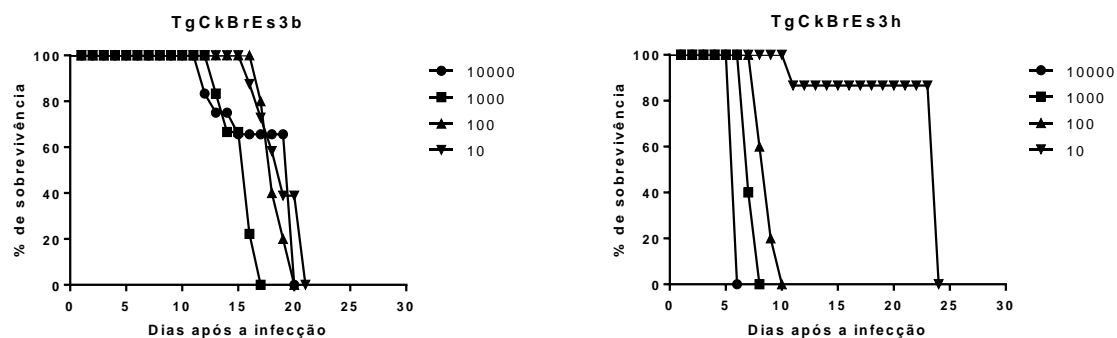


Figura 4: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos do isolado TgCkBrEs3b e TgCkBrEs3h de *T. gondii*.

#### TgCkBrEs4b e TgCkBrEs4h

Em relação ao isolado **TgCkBrEs4b**, 20 animais foram inoculados com doses de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  taquizoítos e nenhum animal sobreviveu. Os animais inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  taquizoítos sobreviveram apenas sete a dez dias após a infecção. Os demais morreram até o 22º dia após a infecção, com ascite e taquizoítos no peritônio. Nenhum dos 20 animais infectados com o isolado **TgCkBrEs4h** sobreviveram. A taxa de sobrevivência começou a diminuir a partir do 11º e atingiu o zero no 27º dia após a infecção, todos com presença de ascite e taquizoítos no peritônio, dois animais inoculados com  $10^1$  taquizoítos apresentaram cistos no cérebro.

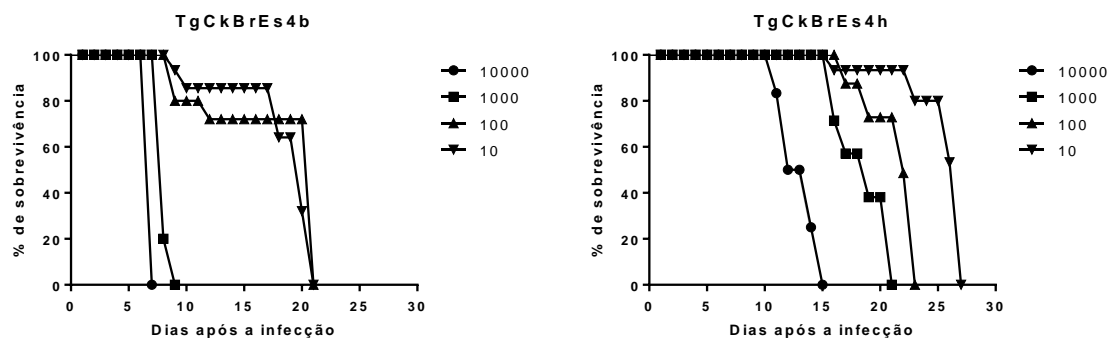


Figura 5: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos do isolado TgCkBrEs4b e TgCkBrEs4h de *T. gondii*.

### TgCkBrEs5b e TgCkBrEs5h

Quanto ao isolado **TgCkBrEs5b**, 20 animais foram inoculados. A sobrevivência começou a diminuir no 9º dia após infecção e chegou a 0 no 19º dia. Todos apresentaram ascite e taquizoítos no peritônio. Um animal com o inóculo de  $10^1$  taquizoítos sobreviveu após 30 dias de infecção, porém a pesquisa de anticorpos anti *T. gondii* pelo ELISA foi negativa. Não foi encontrado cisto no cérebro desse animal e, portanto, foi descartado. Em relação ao isolado **TgCkBrEs5h**, dos 20 animais inoculados, 16 não sobreviveram a partir do 12º e 24º dias após a infecção. Dentre os quatro sobreviventes inoculados com  $10^1$  taquizoítos, apenas dois apresentaram anticorpos anti – *T. gondii* pelo método de ELISA. Os outros dois foram descartados.

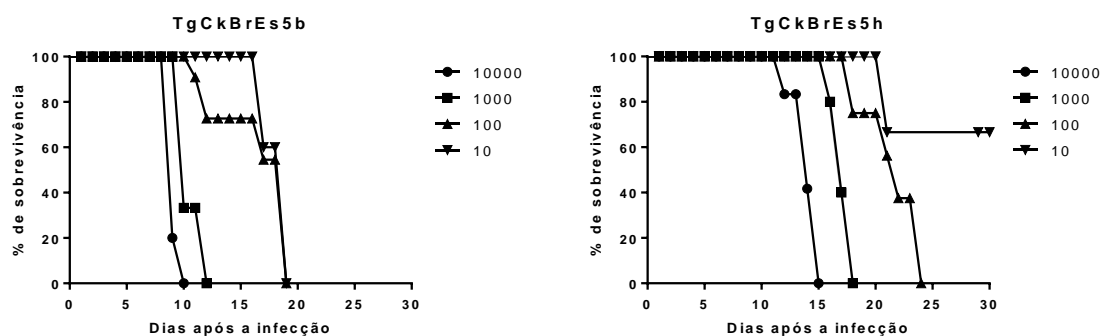


Figura 6: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/ C inoculados pela via intraperitoneal com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  taquizoítos do isolado TgCkBrEs5b e TgCkBrEs5h de *T. gondii*.



Tabela 7: Classificação da virulência em camundongos Balb/ C dos isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas caipira no estado do Espírito Santo.

Isolados	10 <sup>4</sup> taq.	10 <sup>3</sup> taq.	10 <sup>2</sup> taq.	10 <sup>1</sup> taq.	Classificação da virulência
<b>TgCkBrEs1b</b>	5*/5**	4/4	5/5	2/2	Virulento
<b>TgCkBrEs2b</b>	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
<b>TgCkBrEs3b</b>	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
<b>TgCkBrEs4b</b>	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
<b>TgCkBrEs5b</b>	5/5	5/5	5/5	4/4	Virulento
<b>TgCkBrEs1h</b>	5/5	5/5	5/5	0/2	Intermediária
<b>TgCkBrEs2h</b>	5/5	5/5	2/2	2/2	Virulento
<b>TgCkBrEs3h</b>	5/5	5/5	5/5	3/3	Virulento
<b>TgCkBrEs4h</b>	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
<b>TgCkBrEs5h</b>	5/5	5/5	5/5	1/3	Intermediária

\*Número de camundongos BALB/c que morreram em relação ao \*\*total de camundongos inoculados e confirmadamente infectados (diagnostico parasitológico e/ou por ELISA).

## 5.5 ANÁLISE GENOTÍPICA

Todos os 10 isolados obtidos por bioensaio foram genotipados com sucesso com 13 marcadores. Os resultados da análise dos 12 marcadores: SAG1, SAG2 (3'SAG2 e 5'SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2 new, CS3 e Apico, estão apresentados a seguir e sumarizados nas tabelas 8 e 9.

## L358

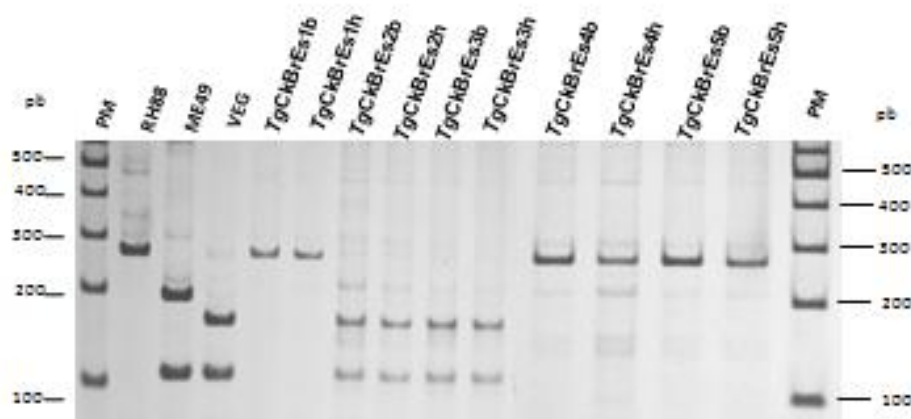


Figura 7: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus L358 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene L358 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HaeIII+NlaIII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

## c29-2

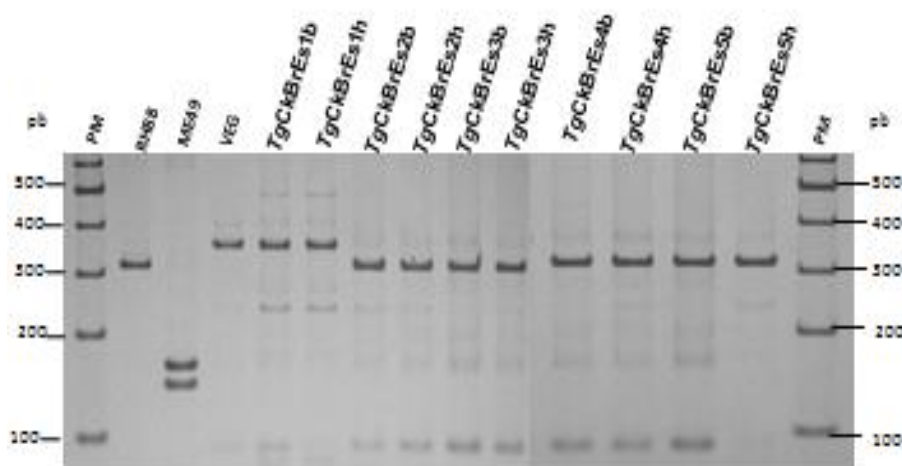


Figura 8: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c29-2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene c29-2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HpyCH4IV+RsaI. Os fragmentos

foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

### c22-8

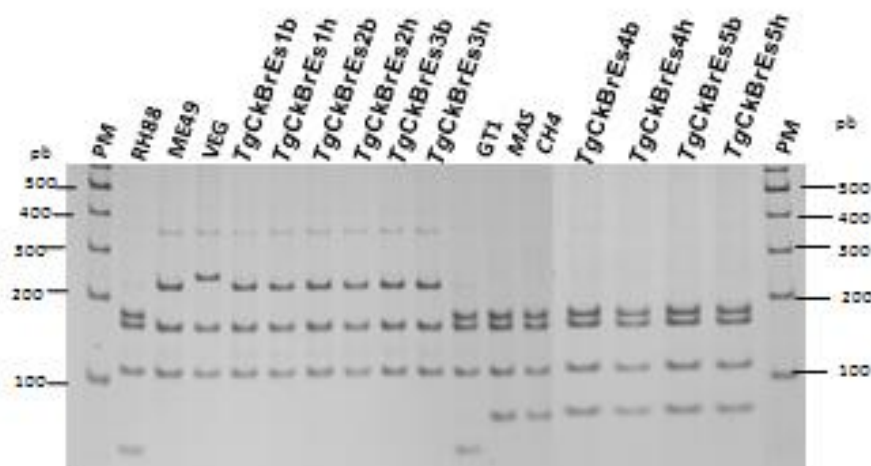


Figura 9: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c22-8 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene c22-8 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição BsmAI+MboII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II), VEG (Tipo III), GT1 (tipo I), MAS (U-1) e CH4 (U-1) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

## PK1



Figura 10: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus PK1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene PK1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição Aval+RsaI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega100pb).

## SAG1

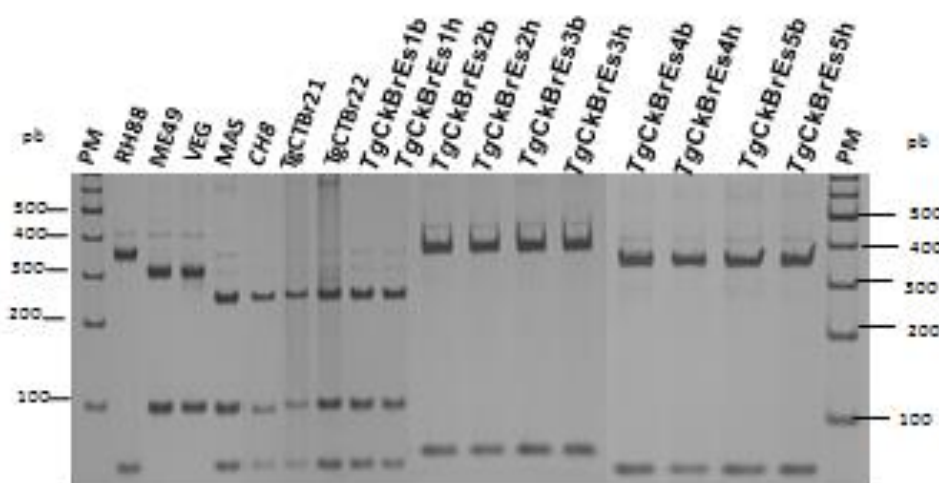


Figura 11: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição Sau96I+HaeII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II),

VEG (Tipo III), MAS (U-1), CH8 (U-1), TgCtBr21 (U-1) e TgCtBr22 (U-1) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

### GRA6

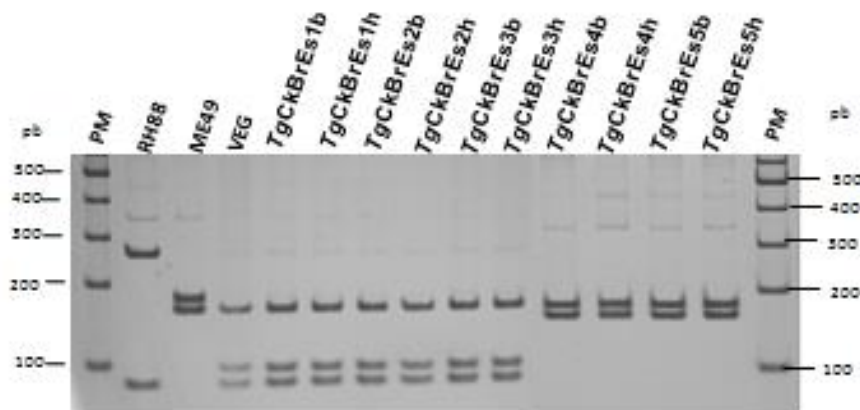


Figura 12: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus GRA6 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene GRA6 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MseI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

### BTUB

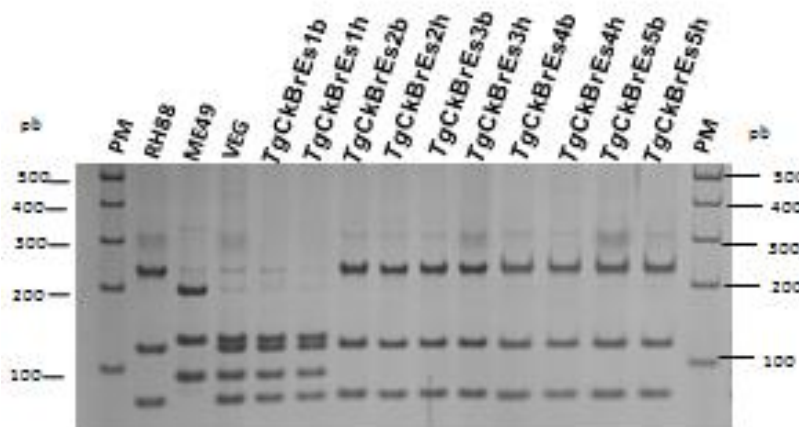


Figura 13: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus BTUB de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene BTUB foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com endonucleases de restrição BsiEI + TaqI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb).

## Cs3

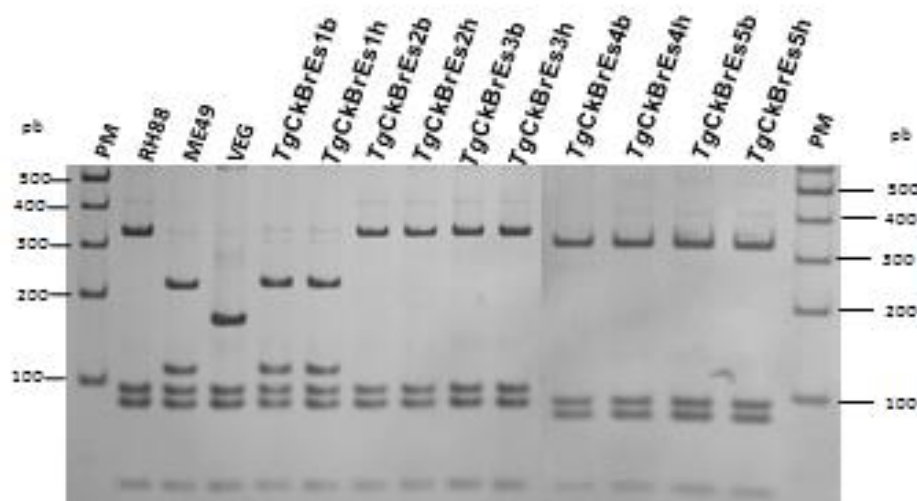


Figura 14: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus Cs3 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O cromossomo VII Cs3 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com endonucleases de restrição Nla III - Mbol. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb).

## SAG2 NEW

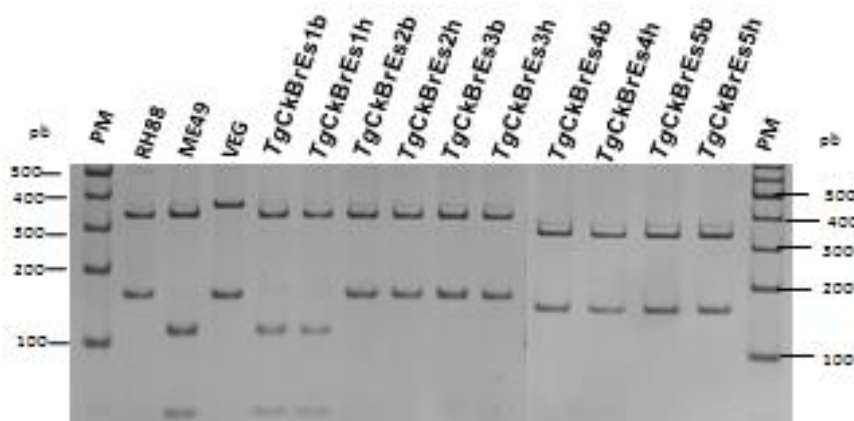


Figura 15: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG2 NEW de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG2 NEW foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HinfI+Taql. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

## 5'SAG2

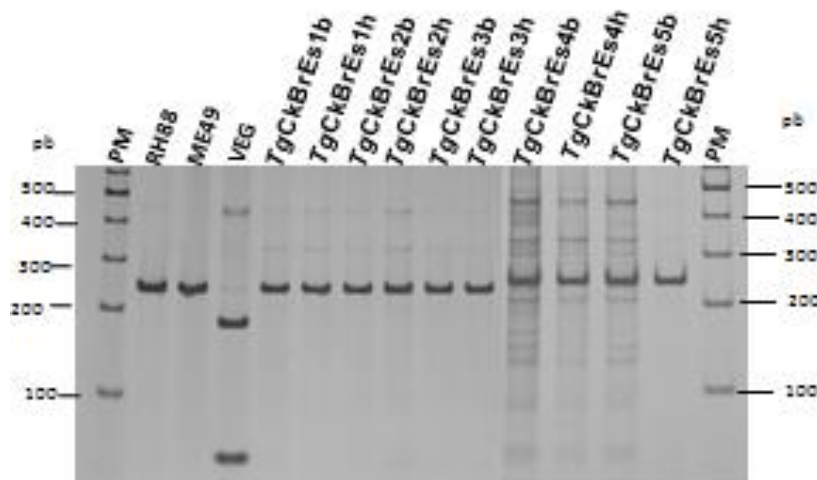


Figura 16: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 5'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene 5'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MboI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

## 3'SAG2

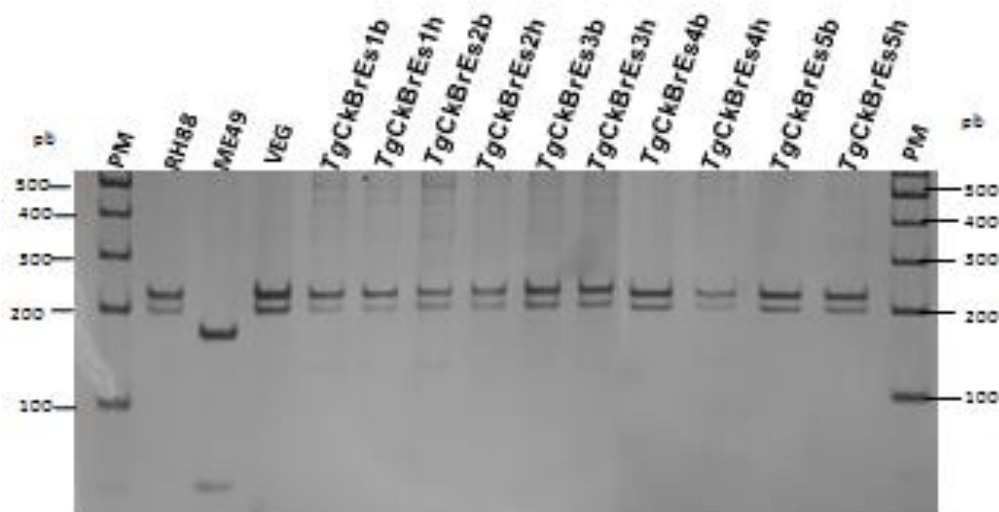


Figura 17: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 3'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene 3'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonucleases de restrição HhaI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).



## SAG3

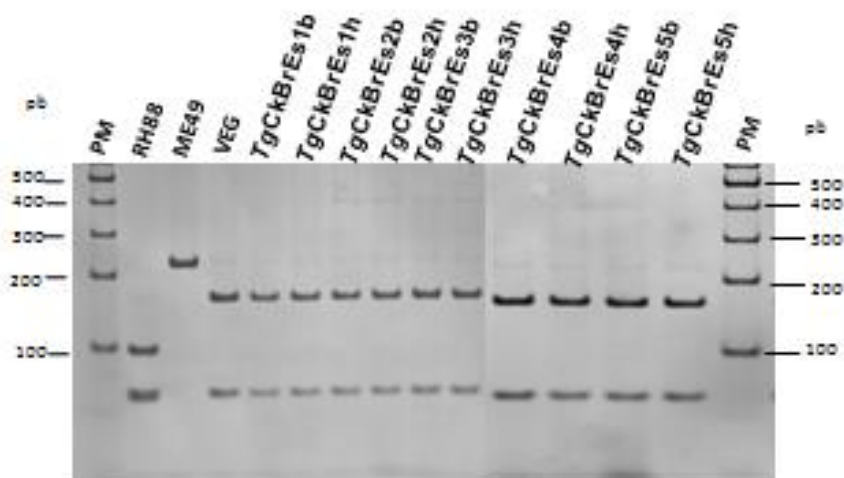


Figura 18: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG3 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene SAG3 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição Nci I. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

## Apico

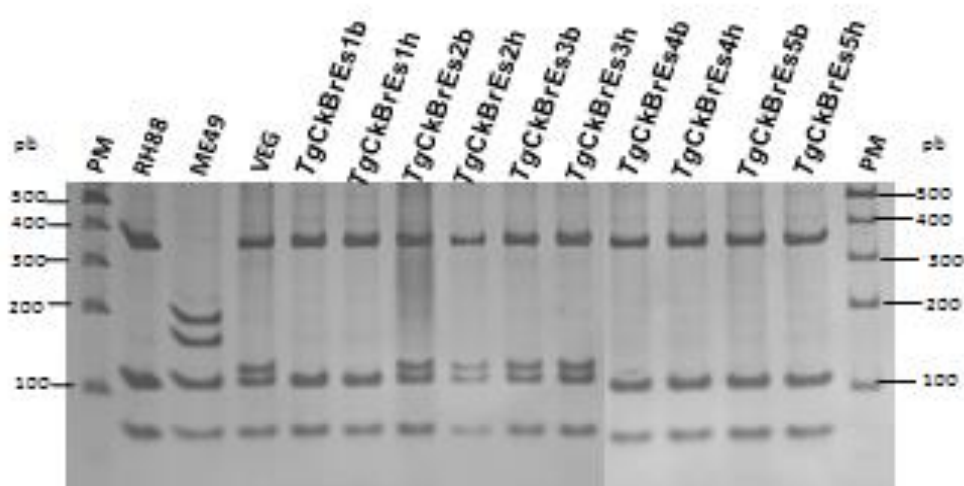


Figura 19: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus Apico de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Espírito Santo, Brasil. O gene Apico foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição AfIII+Ddel. Os fragmentos foram



revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. PM = peso molecular (Promega 100pb).

Os isolados tiveram o mesmo genótipo dentro da mesma propriedade e diferentes na mesma região, ainda que as propriedades fossem localizadas no mesmo município. Não houve diferença entre os isolados obtidos a partir do cérebro ou do coração da mesma ave.

Com o auxílio do banco de dados ToxoDB foi possível identificar genótipos semelhantes já isolados em outras regiões do país e do mundo, além de já terem sido isolados também em outros animais.

Apesar de serem conhecidos como uma linhagem clonal do Brasil, neste trabalho nenhum isolado foi identificado como sendo dos tipos: BrI, BrII, BrIII e BrIV ou genótipo clonal (Tipo I, II ou III).

Tabela 8: Associação entre os genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* com propriedade de origem, a virulência e similaridade com outros isolados já descritos

Isolados	Propriedade	Virulência	Semelhante
TgCkBrEs1b	I	Virulenta	TgCkBrRj3 #206 *
TgCkBrEs1h		Intermediária	
TgCkBrEs2b	II	Virulenta	TgCkBr30 / TgCkBr34 / TgCkBr59/ TgCkBr67
TgCkBrEs2h		Virulenta	
TgCkBrEs3b		Virulenta	
TgCkBrEs3h		Virulenta	
TgCkBrEs4b	IV	Virulenta	534N / BOF / FOU / GPHT / TgBrCp_14 / TgCatBr17 / TgCatBr2 / TgCatBr42 / TgCatBr47 etc
TgCkBrEs4h		Virulenta	
TgCkBrEs5b		Virulenta	
TgCkBrEs5h		Intermediária	

Tabela 9: Genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* de galinha caipira obtidos do Estado do Espírito Santo

Isolados	Marcadores PCR-RFLP													
	L358	c29-2	c22-8	PK1	SAG1	GRA6	BTUB	CS3	SAG2 new	5' SAG2	3' SAG2	5' - 3' SAG2	APICO	SAG3
<b>RH88*</b>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I ou II	I ou III	I	I	I
<b>ME49*</b>	II	II	II	II	II ou III	II	II	II	II	I ou II	II	II	II	II
<b>VEG*</b>	III	III	III	III	II ou III	III	III	III	III	III	I ou III	III	III	III
<b>TgCkBrEs1b</b>	I	III	II	III	U-1	III	III	II	II	I ou II	I ou III	I	I	III
<b>TgCkBrEs1h</b>	I	III	II	III	U-1	III	III	II	II	I ou II	I ou III	I	I	III
<b>TgCkBrEs2b</b>	III	I	II	I	I	III	I	I	I	I ou II	I ou III	I	III	III
<b>TgCkBrEs2h</b>	III	I	II	I	I	III	I	I	I	I ou II	I ou III	I	III	III
<b>TgCkBrEs3b</b>	III	I	II	I	I	III	I	I	I	I ou II	I ou III	I	III	III
<b>TgCkBrEs3h</b>	III	I	II	I	I	III	I	I	I	I ou II	I ou III	I	III	III
<b>TgCkBrEs4b</b>	I	I	U-1	I	I	II	I	I	I	I ou II	I ou III	I	I	III
<b>TgCkBrEs4h</b>	I	I	U-1	I	I	II	I	I	I	I ou II	I ou III	I	I	III
<b>TgCkBrEs5b</b>	I	I	U-1	I	I	II	I	I	I	I ou II	I ou III	I	I	III
<b>TgCkBrEs5h</b>	I	I	U-1	I	I	II	I	I	I	I ou II	I ou III	I	I	III

U-1: não usual 1; \* Cepas padrão, RH88 (tipo I), ME49 (tipo II), VEG (tipo III).

## 6 DISCUSSÃO

Em criações domésticas de galinhas caipiras, em propriedades rurais do Espírito Santo, constatamos que, nas localidades da região da Grande Vitória, Cariacica e Viana, não houve galinhas que apresentassem anticorpos anti *T. gondii* no soro quando avaliadas pela técnica de HAI. Isso já havia sido demonstrado por Beltrame (2010). As regiões de maior prevalência apresentadas no estado foram as regiões de Colatina e Linhares, por apresentarem um clima quente e úmido e áreas alagadas. Partindo desse conhecimento prévio e da dificuldade de obtenção de aves positivas nessa região, partimos para a região de montanha do estado, em Venda Nova do Imigrante, das 34 aves analisadas, 13 (38%) apresentaram anticorpos anti *T. gondii*. Este município já foi descrito como região de grande prevalência de toxoplasmose ocular, com 11,27% de casos positivos (ABREU et al., 1998), mostrando-se um local favorável à presença do parasito, considerando a média nacional de 1,6% (ZANETTI & PLETSCHE, 2007).

Os resultados desse estudo permitem maior conhecimento sobre áreas do estado de contaminação ambiental e servem de alerta sobre os cuidados que devem ser tomados na preparação da carne desses animais para consumo humano. A preocupação quanto a toxoplasmose é tão focalizada nos gatos domésticos que é comum as pessoas se esquecerem que o consumo de carne mal cozida contribui de forma importante com o ciclo de transmissão da doença.

Para a primeira etapa da pesquisa de anticorpos anti *T. gondii*, foi utilizado o método de Hemaglutinação indireta (HAI), pois segundo Beltrame (2010) a concordância entre MAT e HAI é de 82%. A técnica utilizada se destina a pesquisa de imunoglobulinas da classe G (Ig G), não sendo eficiente para detectar infecção aguda ou congênita (LIU et al., 2015). O teste de HAI pode ser considerado confiável, além da vantagem de ter um baixo custo e ser de fácil aplicação, quando comparado com outros métodos.

Utilizou-se, para o isolamento, tecidos cardíacos de galinhas, por serem considerados uma iguaria na culinária. Os cistos, segundo Dubey (1998), são

mais abundantes em tecidos neural, muscular e cardíaco. E para garantir maior possibilidade de obtenção de parasitos utilizamos também o cérebro do animal. Aigner e colaboradores (2010), já haviam demonstrado por PCR em tempo real, que a quantidade de parasito por grama de tecido (cardíaco ou neural) não tem diferença significativa em aves com sorologia positiva.

Segundo Dubey e colaboradores (2005), o sucesso no isolamento depende do número de animais inoculados, da quantidade de tecido utilizado e da concentração do parasito nos tecidos. No nosso trabalho, cérebros e corações inteiros foram usados para isolar o *T. gondii* e o tecido digerido foi inoculado em cinco animais. O isolamento do *T. gondii* foi de 100%, pois todos os animais inoculados morreram e/ou apresentaram ascite, com presença de taquizoítos no peritoneo entre 7 e 15 dias após o inóculo, o que indica que a concentração do parasito nos tecidos era alta.

De modo geral, a frequência de isolamento tem sido relatada de 28,4% (OLIVEIRA et al., 2009) a 70% (DUBEY et al., 2002). Casos de 100% de sucesso são pouco relatados. Obtivemos esse ótimo resultado confirmando que as etapas foram cumpridas com êxito, desde a escolha do método para detecção de anticorpos, das propriedades, o dos tecidos, a pepsinização, inoculação e observação dos animais infectados.

Dependendo da mortalidade em camundongos, o *T. gondii* pode ser considerado virulento, não virulento ou de virulência intermediária. As cepas RH (tipo I) são sempre virulentas independente da dose, o modelo experimental morre mesmo com inóculo de  $10^0$  taquizoítos, já as cepas avirulentas (tipo III) com doses acima de  $10^3$  estabelecem uma infecção crônica, as chamadas cepas cistogênicas, as cepas tipo II pareiam entre virulenta e avirulenta, variando o fenótipo do parasito (FERREIRA; MARTINS; VITOR, 2001). Se a caracterização dos isolados deste trabalho fosse apenas quanto a virulência, seriam semelhantes as cepas do Tipo I e II, pois nenhum foi considerado avirulento, e apenas as amostras obtidas a partir do coração das aves (TgCkBrEs1h e TgCkBrEs5h) foram consideradas de virulência intermediária. Estes resultados estão de acordo com observações

feitas por DUBEY e colaboradores (2003) e de BELTRAME e colaboradores (2012), que cepas virulentas em camundongos circulam em hospedeiros assintomáticos no Brasil.

Segundo Gilbert e colaboradores (2008), há um predomínio de cepas virulentas no Brasil quando comparados com a Europa, o que corrobora com nossos resultados encontrados. O trabalho relata ainda que a severidade dos casos de toxoplasmose ocular no Brasil é mais grave, quando comparados com a Europa. Sugerindo que o observado no modelo experimental, poderia se aplicar ao ser humano.

Mesmo sabendo que houveram características fenotípicas diferentes, já que os isolados do cérebro mataram mais rápido e nenhum foi considerado de virulência intermediária (tabela 5), os isolados obtidos neste estudo não se diferenciaram, na caracterização molecular, quanto a origem do órgão do qual foi obtido, portanto podemos simplificar a nomenclatura dos isolados e descrever apenas como: TgCkBrEs1, TgCkBrEs2, TgCkBrEs3, TgCkBrEs4, TgCkBrEs5. Para um conhecimento mais profundo do isolado, Dubey e colaboradores (2008) sugerem que nos casos onde a caracterização fenotípica tenha sido diferente da molecular seja feito o sequenciamento do DNA para determinar se os isolados são realmente idênticos ou onde seriam essas diferenças.

Apesar da possibilidade de haver co-infecção, como relatado por Dubey e colaboradores, em 2007, essa observação não foi avaliada neste estudo e os isolados foram iguais na mesma propriedade, porém diferentes dentro do mesmo município. Portanto de modo geral em um micro ambiente tende a ter um predomínio de uma cepa.

Observamos que o isolado TgCkBrEs1 tem o mesmo genótipo do isolado TgCkBrRj3, conforme demonstrado no ToxoDB, que foi obtido de galinha caipira no município de Rio Bonito, estado do Rio de Janeiro. Este mesmo genótipo é equivalente ao genótipo 206, já descrito na literatura por outros autores (PENA et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013). É interessante observar

que no mesmo ano esse isolado foi descrito por autores diferentes e em hospedeiros diferentes. Pena e colaboradores (2013), obtiveram o mesmo isolado a partir de uma galinha caipira do município de Colatina, estado do Espírito Santo, e no mesmo ano Carneiro e colaboradores encontraram o este isolado no sangue de um bebê, de 45 dias de vida, com toxoplasmose congênita em Minas Gerais. Levando em consideração a proximidade das regiões citadas, este fato evidencia uma linhagem comum circulante.

Outro isolado que foi semelhante a um relatado na literatura, foi o TgCkBrEs4 e TgCkBrEs5, considerados geneticamente idênticos). Em 2011, Ferreira e colaboradores, descreveram o isolado #6, semelhante geneticamente ao isolado neste trabalho, em um paciente de 45 anos, HIV positivo com neurotoxoplasmose, caracterizado por encefalite difusa. De acordo com o banco de dados ToxoDB, este isolado já foi obtido a partir gato, galinha, cão, entre outros. Mesmo que ainda não esteja claro se o isolado terá o mesmo comportamento virulento em humanos, como nos camundongos (DARDÉ, 2008; BOOTHROYD; GRIIG, 2002), já que para isso depende a quantidade do inóculo, via de infecção e estado imunológico do hospedeiro, o fato desses isolados serem identificados nos seres humanos merece grande atenção, já que são cepas recombinantes e isso pode gerar novos mecanismos de patogenicidade.

Observamos neste trabalho que, quanto ao marcador CS3, todos os isolados apresentaram o alelo I ou o II e, quanto à caracterização biológica, nenhum animal foi considerado avirulento, o que corrobora com as pesquisas de Khan e colaboradores (2005), Pena e colaboradores (2008) e Silva e colaboradores (2014), que têm sugerido a relação entre a presença do alelo I e II do marcador CS3 e a virulência em camundongos, e do alelo III com a cronicidade da cepa.

## 7 CONCLUSÃO

1. Observou-se 100% de isolamento do *T. gondii* a partir do cérebro e coração de galinhas sorologicamente positivas, coletadas na região de Venda Nova do Imigrante.
2. Os isolados TgCkBrEs1, TgCkBrEs2, TgCkBrEs3, TgCkBrEs4, TgCkBrEs5 de *T. gondii* foram considerados virulentos ou de virulência intermediária pela caracterização biológica.
3. A caracterização genética não demonstrou diferença entre isolados do cérebro e coração da mesma galinha, nem na mesma propriedade de origem.
4. Os isolados obtidos de cada uma das três propriedades de Venda Nova do Imigrante são geneticamente iguais dentro da mesma propriedade, mas diferentes quando comparados entre as propriedades.
5. O TgCkBrEs1 foi geneticamente igual ao isolado #206, já descrito na literatura e identificado como causador de toxoplasmose congênita.
6. O TgCkBrEs4 e TgCkBrEs5 foram iguais ao isolado #6, já descrito na literatura como causador de neurotoxoplasmose.

## 8 REFERÊNCIAS

ABREU, M.T. *et al*, Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v: 61, p. 540-545,1998.

AIGNER, C. P. *et al*. Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v: 105, n: 7, p. 935-937, Nov. 2010.

BARBOSA, M. V. F. *et al*. Frequência de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia, Brasil. **Brazilian Science**, v:40, p.457-465, 2003.

BELTRAME, M. A. V. **Levantamento soroeepimiológico e isolamento do *Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) no estado do Espírito Santo, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Universidade Federal do Espírito Santo, 2010.

BELTRAME, M. A. V. *et al*. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v: 188, p. 225-230, 2012.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection, do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v: 5, p. 438-442, 2002.

BOWIE, W. R. *et al*. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**, v: 350, n: 9072, p: 173-177, 1997.

CARNEIRO, A. C. A. V. *et al*. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v: 51, n: 3, p. 901-907, 2013.



CASARTELLI-ALVES, L. et al. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v: 204, n: 3-4, p: 346-351, Aug. 2014.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Toxoplasmosis: Biology.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

CLEMENTINO, M. M. et al. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v: 146, p. 199-203, 2007.

CONRAD, P. A. et al. Transmission of *Toxoplasma*: clues from study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v: 35, n: 11-12, p. 1155-1168, Oct. 2005.

COVRE, K. C. **Frequência de resultados positivos para *Toxoplasma gondii* em exames sorológicos realizados em cães e gatos na região metropolitana de Vitória, Espírito Santo, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

CRISTINA, N. et al. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v.77, n.3, p.266-268, 1991.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**, v: 15, p. 366-371, 2008.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animal and man. **Boca Raton** 220 pp. 1988.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v: 205, p: 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, 74, 75-77, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v: 11, n: 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J. P. *et al.* Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v: 32, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J.P. *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **The Journal of Parasitology**, v: 89, p.1063-1064, 2003.

DUBEY, J.P. *et al.* Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. **The Journal of Parasitology**, v: 91, p. 557–560, 2005.

DUBEY J. P. *et al.* Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. **Veterinary Parasitology**, v: 139, n: 1-3, p. 26-36, Jun. 2006.

DUBEY, J. P. *et al.* Endemic avian toxoplasmosis on a farm in Illinois: clinical disease, diagnosis, biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from chicken (*Gallus domesticus*), and a goose (*Anser anser*). **Veterinary Parasitology**, v: 148, n: 3-4, p: 207-212, Jul. 2007.

DUBEY, J. P. *et al.* Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v: 134, p. 1559-1565, 2007a.

DUBEY, J. P. *et al.* High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. **International Journal for Parasitology**, v: 38, p. 999-1006, 2008.

ELSAID, M. M. *et al.* Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v: 96, p. 99-104, 2001.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v: 104, n. 2, p. 133-148, Mar. 2009.

FERREIRA, A. M.; MARTINS, M.S.; VITOR, R. W. A. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated in Brazil. **Parasite**, v: 8, p. 99–105. 2001.

FERREIRA, A. M. *et al.* Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, n.1, p.22-31, 2006.

FERREIRA, I. M. R. *et al.* *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo state, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v: 129, p. 190-195, 2011.

FILICE, G.; MERONI, V.; CARNEVALE, G.; OLLIARO, P.; CAROSI, G. Comparison of ELISA and indirect immunofluorescence in the detection of IgG and IgM antitoxoplasma antibodies. **Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese**, v: 62, p. 445–450, 1983.

FUX, B. *et al.* Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immunity**, v:71, n.11, p.6392-6401, 2003.

GAMBLE, H. R.; DUBEY, J. P.; LAMBILLOTTE, D. N. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. **Veterinary Parasitology**, v: 128, p. 177–181, 2005.

GILBERT, R. E. *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v: 2, n: 8, p. 1-7, 2008.

HOLLIMAN, R. E.; BARKER, K.F.; JOHNSON, J. D. Selective antenatal screening for toxoplasmosis and the latex agglutination test. **Epidemiology and Infection**, v: 105, n: 2, p.409-414, 1990.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Diseases**, v.172, p.1561-1566, 1995.

HOWE, D. K. *et at.* Acute virulence in mice associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Imunity**, v.64, p. 5193-5198, 1996.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MILTON, M. L. The resistance of the encysted form. **The Journal of Parasitology**, v: 46, p. 11-21, 1996.

JOHNSON A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, v.13, p.393-397, 1987.

KHAN, A. *et al.* Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v: 33, p. 2980–2992, 2005.

KHAN, A. *et al.* Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v.12, n.6, p. 942-949, 2006.

KHAN, A. *et al.* Recent global sweep of *T. gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n.37, p. 14872 -14877, 2007.

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 35, n. 4, p. 518-520, Nov. 1988.

LIU, Q. *et al.* Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v: 292, n: 8, p. 1-14, 2015.

MACRÌ, G. *et al.* Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. **Parasitology Research**, v: 105, n: 2, p: 35-40, Feb. 2009.

MAZUMDER, P. *et al.* Latex agglutination test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v: 26, n: 11, p: 2444-2446, Nov. 1988.

MENDONÇA, A.O. **Detecção de *Toxoplasma gondii* em lingüiças suínas tipo fresco, comercializadas no município de Botucatu-SP.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

MILLER, M. A., *et al.* Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). **Journal Parasitology**, v: 88, p. 594–599, 2002.

OLIVEIRA, L. N. *et al.* *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast region of Brazil. **Journal Parasitology**, v: 95, n: 1, p: 235-237, 2009.

ONCEL, T., *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* seropositivity in sheep in Yalova by Sabin Feldman dye test and latex agglutination test. **Turkiye Parazitoloji Dergisi**, v: 29, n: 1, p. 10-12, 2005.

PENA, H. F. J. *et al.* Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v: 38, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F. J. *et al.* PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v: 192, p. 111-117, 2013.

REITER-OWONA, I. *et al.* The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v: 77, n: 11, p. 929–935, 1999.

SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. **Science**, v: 85: p. 336-338, 1937.

SAGRILO, E. *et al.* Validação do sistema alternativo de criação da galinha caipira, 2003. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>. Acessado em: 25 de nov. de 2015.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v: 90, p. 655–656, 1993.

SANTOS, T.R., *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, v: 171, p.53–57, 2010.

SHWAB, E. K. *et al.* Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v: 141, p. 453-461, 2014.

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v.359, p. 82-85, 1992.

SILVA, A. V. **Avaliação da infecção de ratos Fischer com duas amostras geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*: cinética de anticorpos, reisolamento em camundongos e reação em cadeia pela polimerase.** Tese (Doutorado em Biologia Tropical), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

SILVA, L. A. *et al.* Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **Plos One**, v: 9, n: 2, p: 1-7, 2014.

SU, C. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v.36, p. 841-848, 2006.

SU, C. *et al.* Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, p: 1-11, 2009.

SU, C.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma*: In molecular detection of foodborne pathogens, **Boca Raton**, FL, USA, p. 741–753, 2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WESS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v: 30, n: 12-13, p. 1217-1258, Nov. 2000.

VAUDAUX, J. D. *et al.* Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **The Journal of Infections Diseases**, v: 208, n: 8, p. 1226-1233, 2010.

VAZ, R. S. *et al.* Toxoplasmose congênita: uma doença negligenciada? Atual política de saúde pública brasileira, **Field Actions Science Reports**, v: 3, 2011. Disponível em: <http://factsreports.revues.org/1107>

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina**, Londrina, v: 13, n: 1, p: 69-75, Mar. 1992.

VITOR, R. W. A. *et al.* Toxoplasmose experimental em cabras gestantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v: 44, p. 501–512, 1992.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International journal for parasitology**. v: 39, n:8, p. 895–901, 2009.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to anencephalitozoon (encephalitozic anencephalomyelitis): a new protozoan disease of man. **Bulletin Neurology Institute of New York**, v: 6, p. 306-335, 1937.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Food Safety and Zoonoses. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. **Microbiological Risk Assessment Series**, Rome, n: 23, 302 p. 2014.

ZANETTI, L.; PLETSCHE, M. U. Prevalência de toxoplasmose ocular em um consultório oftalmológico do município de Ijuí-RS. **Revista Contexto e Saúde**, v: 7, n: 13, p. 15-20, 2007.

ZHU, J. *et al.* Seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. **Veterinary Parasitology**, v: 158, p. 360–363, 2008.